“ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ”
“EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY”
Науково-практичний журнал/Scientific-practical journal

Наукові статті / Research article
ECPB 2019, 1(85): 38–43. <https://doi.org/>

УДК 616.62.001.6–008.222–08–059: 612.616.31

Аденілатна система еритроцитів щурів з гіперактивним сечовим міхуром за умов його корекції лікарськими засобами гормональної енерготропної дії

А.І. ЯЦИНА¹, Р.С. ВАСТЬЯНОВ¹, Н.В. ДЬЯЧКОВА², М.А. ХАРХОТА³, Ф.І. КОСТЄВ¹

*¹ Одеський національний медичний університет МОЗ України,
Одеса, Україна*

*² ДУ Національний інститут хірургії та трансплантології ім. Шалімова НАМН
України, Київ, Україна*

*³ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
Київ, Україна*

E-mail: yatsyna@gmail.com

За даними ICS синдром гіперактивного сечового міхура (ГАМП) входить в 10 найбільш поширених захворювань, спостерігається приблизно у 100 млн людей у світі й випереджає за частотою захворювань цукровий діабет, виразкову хворобу шлунка і дванадцятипалої кишки [1].

За кількістю витрат це захворювання посідає п'яте місце після артритів, нетримання сечі й остеопорозу. Витрати при ГАМП порівнянні з затратами на лікування астми та остеопорозу. Лікування ГАМП необхідно у всіх випадках, коли наявні симптоми викликають зниження якості життя пацієнта. Враховуючи значний негативний вплив ГАМП на якість життя хворих, можливе призначення терапевтичних заходів ще перед завершенням усіх діагностичних процедур [2].

Оскільки досі точні причини розвитку та патогенез ГАМП залишаються не до кінця з'ясованими, лікування цих хворих в основному залишається симптоматичним. Препаратами вибору при лікуванні ГАМП є М-холіноблокатори [3]. Застосування М-холіноблокаторів при ГАМП дає змогу знизити частоту сечовипускань, знизити кількість епізодів нетримання сечі, підвищити функціональну ємність сечового міхура. Також є відомості про перспективність використання флавоноїдів у терапії ГАМП [4–6], деякі методи захищені патентом на винахід [7,8].

Враховуючи не до кінця з'ясовану природу розвитку та патогенез ГАМП, перспективною є комбінована терапія препаратами з різноспрямованими механізмами дії. Метою нашої роботи було дослідити якісні та кількісні показники аденілатної системи еритроцитів щурів з гіперактивним сечовим міхуром за його корекції композиціями тестостерона/естрадіола з кверцетином.

Матеріали й методи дослідження. Дослідження впливу композицій тестостерону/естрадіола з кверцетином на аденілатну систему еритроцитів

проводили на жіночих особинах щурах лінії Wistar масою 160–180 г з медикаментозно відтворним гіперактивним сечовим міхуром.

Дослідних тварин утримували в стандартних умовах віварію експериментальної лабораторії ДУ «Національний інститут хірургії і трансплантології ім. А.А. Шалімова НАМН України» (м. Київ). Усі досліді на тваринах проводилися згідно з конвенцією Ради Європи про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Прототипом моделі послужила методика, запропонована Державним В.М. і співавт. [9]. Експериментальна модель ГАСМ створювалася введенням внутрішньочеревно препарату «Хомвіотензін» (Мауерман-Арцнайміттель КГ, Німеччина), щодня протягом 2 тижнів у дозі 0,45 мг/кг маси тіла в розрахунку на діючу речовину резерпін.

Тварини методом випадкової вибірки були поділені на три групи. Тваринам першої групи (інтактні тварини, $n = 10$), замість фармпрепаратів вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину. Тваринам другої групи ($n = 10$) з експериментально створеним ГАСМ фармакологічну корекцію не проводили, і вони слугували групою порівняння. Третій групі тварин ($n = 40$) з ГАСМ по 10 тварин у кожній з підгруп проводили фармакологічну корекцію тестостероном та естрадіолом, кожним окремо та в комбінації з кверцетином відповідно. Тестостерон та естрадіол вводили в дозах 1,0 і 0,2 мг/особину відповідно, флюовонід вводили в дозі 10 мг/особину на добу.

Кров (1,5 мл) для кількісного визначення аденілових нуклеотидів відбирали з хвостової вени тварин. До досліджуваної крові додавали 2,0 мл 8% HClO_4 для лізису еритроцитів і вивільнення аденілових нуклеотидів. Отриманий лізат нейтралізували 6,0 н розчином KOH , після чого суміш витримували протягом 15 хв при 4°C . Високомолекулярні сполуки відділяли від аналітів концентратором Amicon® Ultra – 2. Отримані зразки безпосередньо вводили в хроматограф.

Визначення вмісту показників аденілатної системи еритроцитів проводили за модифікованою нами методикою. Розділення проводили на колонці Zorbax SBaq – C18 (4,6 мм×150 мм, 5,0 мкм). Рухома фаза – 0,5 М ацетат амонію (рН 6,8): ацетонітрил (99 : 1), швидкість потоку 0,6 мл/хв, детекція при 250 нм. Калібрувальну криву будували з використанням стандартних розчинів АТФ, АДФ і АМФ. Згідно з отриманими даними були розраховані такі показники енергетичного обміну: енергетичний заряд (ЕЗ) за формулою $\text{ЕЗ} = (\text{АТФ} + 1/2\text{АДФ})/(\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ})$; енергетичний потенціал (ЕП) за співвідношенням $\text{ЕП} = \text{АТФ}/\text{АДФ}$.

Усі показники розраховували на 14-й і 28-й день від початку корекції. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням t -критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Кров – сполучна тканина, що чутливо реагує на будь-які зміни в макроорганізмі. Еритроцити як одні з головних кров'яних клітин належать до найбільш репрезентативних моделей дослідження енергетичного стану макроорганізму, оскільки перенос ними кисню є АТФ-залежним та чутливо реагує на якісні та кількісні зміни в метаболічній активності макроорганізму. Відомо, що кількісне співвідношення АТФ, АДФ та АМФ (аденілатний пул) – маркери енергетичного профілю клітин [10,11].

Логічно припустити, що за розвитку ГАСМ, який супроводжується частим сечовипусканням (тобто активним скороченням м'язів стінки сечового міхура) будуть відбуватися негативні зміни в аденілатному пулі клітин.

Ми встановили, що перебіг та корекція ГАСМ гормональними препаратами окремо та в композиції з кверцетином у дослідних тварин супроводжувалася кількісними змінами в аденілатній системі (рис. 1).

Рис. 1. Кількісний склад аденілатної системи еритроцитів щурів контрольної (а), дослідної групи тварин (б) і тварин, що отримували композиції тестостерону та естрадіолу (в), композиції статевих гормонів з кверцетином (г)

Відмічено, що перебіг ГАСМ у дослідних тварин супроводжувався значним зниженням вмісту АТФ в еритроцитах з 58,67 % від загальної кількості аденілових нуклеотидів у інтактних до 14,69 % у тварин з медикаментозним ГАСМ. Одночасно з цим значно збільшувався вміст АДФ з 14,99 до 74,65 %, що вказує на розбалансованість біосинтетичних процесів в еритроцитах. Уведення дослідним тваринам композиції з тестостерону та естрадіолу сприяло до нормалізації метаболічних процесів, порушених перебігом ГАСМ. На це вказує підвищення концентрації АТФ до 46,0 % та відповідне зменшення АДФ до 24,9 %.

На нормалізацію енергетичного обміну клітини можна впливати кількома незалежними шляхами, тому ми припустили, що застосування композиції статевих гормонів (тестостерону та естрадіолу) з біофлавоноїдами (кверцетином) буде більш ефективно порівняно з їх окремим застосуванням. Отримані результати підтверджують наше припущення (рис. 1). Так, використання досліджуваної композиції сприяло підвищенню рівню АТФ з 46,00 до 58,23 %. Це свідчить про переважання енергосинтетичних процесів у клітині над енерговитратними.

Для більш повного розуміння механізмів впливу гормональних препаратів на аденілатну систему в еритроцитах щурів ми дослідили показники енергетичного обміну (рис. 2).

Рис. 2. Показники ЕП (а) та ЕЗ (б) в еритроцитах щурів з ГАСМ за фармакологічної корекції статевими гормонами:

1 – група порівняння; 2 – корекція тестостероном; 3 – корекція естрадіолом; 4 – корекція кверцетином; 5 – корекція композицією тестостерону та естрадіолу; 6 – корекція композицією зі статевих гормонів та кверцетину. За 100 % взято відповідні показники контрольної групи тварин

Встановлено, що окрім змін в абсолютних показниках аденілатної системи під впливом досліджуваних препаратів відбуваються зміни в показниках енергетичного обміну клітин. Так, під впливом тестостерону та естрадіолу на 28-му добу корекції показники ЕЗ та ЕП відновлювалися до відповідних значень контрольної групи.

Отже, ми показали, що композиція тестостерону та естрогену з кверцетином сприяє більш ефективному відновленню якісних та кількісних показників аденілатної системи еритроцитів щурів, ніж їх застосування в монотерапії. Відмічене явище може бути пов'язане зі синергічним/адитивним впливом статевих гормонів та флавоноїдів на тканини й органи малого таза.

Відомо, що гормональний дефіцит супроводжується зниженням кровообігу в органах малого таза, що призводить до ішемії тканин сечостатевої системи. Зменшується діаметр артерій, знижується кількість дрібних судин та товщина їх стінок, що призводить до зменшення трансудації. Механізм дії андрогенів на нижні відділи уrogenітального тракту до теперішнього часу остаточно не вивчений. Існують клінічні дослідження, які свідчать про релаксуючу дію тестостерону на кровоносні судини жінок у постменопаузі. При цьому показано, що тестостерон може впливати на вазодилатацію як ендотелій-залежним (опосередковано, через збільшення синтезу / викиду окису азоту), так і ендотелій-незалежним шляхом [12].

З іншого боку, відомо, що кверцетин та його похідні тривалий час використовуються для лікування та профілактики судинних захворювань, зокрема венозної недостатності. Ангіопротекторна дія кверцетину проявляється після його взаємодії з мішенями в ендотелії, клітинах гладких м'язів та різними компонентами крові. Збільшення венозного тону під впливом біофлавоноїдів сприяє нормалізації кровотоку, зменшенню агрегації еритроцитів та збільшенню оксигенації ендотеліоцитів [5].

Для більш повного розуміння природи ефективності досліджуваних композицій статевих гормонів з флавоноїдом кверцетином потрібно враховувати, що однією з особливостей фармакологічної дії останнього є широкий спектр мішеней дії. Крім прямого позитивного впливу завдяки ангіопротекторній активності кверцетину потрібно враховувати його високі антиоксидантні, мембрано- та гепатопротекторні властивості. Кверцетин

здатний до інгібування ксантиноксидази, що значно зменшує оксидативне пошкодження органів і тканин. Досліджуваний флавоноїд є інгібітором прозапальних ферментів (гіалуронідази, фосфоліпази А, ліпоксигенази, протеїнкінази С).

1. Встановлено, що перебіг ГАСМ у дослідних тварин супроводжувалося значним дисбалансом складових аденілатної системи еритроцитів, за рахунок зниження вмісту АТФ та підвищення вмісту АДФ в еритроцитах, що свідчить про розвиток порушень біосинтетичних процесів.

2. Введення дослідним тваринам композиції з тестостерону/естрадіолу та кверцетину сприяло нормалізації клітинних метаболічних процесів, порушених перебігом ГАСМ за рахунок підвищення компенсаторних механізмів клітинного енергозабезпечення.

3. Ефективність дослідженої композиції статевих гормонів та біофлавоноїдів може бути пов'язано з їх синергічним/адитивним впливом на аденілатну систему клітин.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

ПОСИЛАННЯ

1. Астапенко АВ, Лихачев СА, Забродец ГВ. Нейрогенный мочевого пузыря: патогенез, классификация, клиника, диагностика, лечение. Белорусский мед. журн. 2002;2:4–6 (Astapenko AV, Likhachev SA, Zabrodets GV. Neurogenic bladder: pathogenesis, classification, clinic, diagnosis, treatment. Belarusian honey journals 2002;2:4–6).
2. Michael J Kennelly, William B De Voe. Overactive Bladder: Pharmacologic Treatments in the Neurogenic Population. Rev Urol. 2008;3(10):182–91.
3. Henry Lai H, Teimothy B Boon, Rodney A Appell. Selecting a Medical Therapy for Overactive Bladder. Rev Urol. 2002;4(4):28–37.
4. Juan YS, Chuang SM, Lee YL, Long CY, Wu TH, Chang WC et al. Green tea catechins decrease oxidative stress in surgical menopause-induced overactive bladder in a rat model. BJU international. 2012;110:6b.
5. Yaw-Bin Huang, Ming-Wei Lin, Yun Chao, Chi-Te Huang, Yi-Hung Tsai, Pao-Chu Wu. Anti-oxidant activity and attenuation of bladder hyperactivity by the flavonoid compound kaempferol. International J Urology. 2014;21(1):94–8.
6. Fürer K, Eberli D, Betschart C, Brenneisen R, De Mieri M, Hamburger M, von Mandach U. Inhibition of porcine detrusor contractility by the flavonoid fraction of Bryophyllum pinnatum a potential phytotherapeutic drug for the treatment of the overactive bladder syndrome. Phytomedicine. 2015;22(1):158–64.
7. Seipel Tracey Anne. Herbal compositions for the prevention or treatment of urinary incontinence and overactive bladder. U.S. Patent No. 7/378.115. 27 May 2008.
8. Rodriguez AL. Quercetin-containing composition, methods of making, and methods of using. U.S. Patent Application No. 11/497.318.
9. Державин ВМ, Вишневецкий ЕЛ, Гусев БС. Экспериментальное изучение незатормозженного нейрогенного мочевого пузыря. Урол. и нефрол. 1977;4:32 (Derzhavin VM, Vishnevsky EL, Gusev BS. Experimental study of inhibited neurogenic urinary tummy. Urol. and nephrol. 1977;4:32).
10. Atkinson DE. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Biochemistry. 1966;7:4030–4.
11. Dudzinska W1, Lubkowska A, Dolegowska B, Safranow K, Jakubowska K. Adenine, guanine and pyridine nucleotides in blood during physical exercise and restitution in healthy subjects. Eur J Appl Physiol. 2010;110:1155–62.
12. Морозов СЛ. Современные представления о нейрогенной дисфункции мочевого пузыря. Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2013;58:4 (Morozov SL. Modern ideas about neurogenic dysfunction of the bladder. Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics. 2013;58:4).

RESEARCH ARTICLE

**Adenilate System of Rat Erythrocyts with
a Hyperactive Urinary Bladder for its Correction
by the Compositions of Testosterone/Estradiol with Quercetin**

A.I. YATSYNA¹, R.S. VASTYANOV¹, N.V. DYACHKOVA², M.A. HARHOTA³, F.I. KOSTEV¹

¹ Odessa National Medical University of MPH of Ukraine, Odessa, Ukraine

² SI “Shalimov National Institute of Surgery and Transplantation of NAMS of Ukraine”,
Kyiv, Ukraine

³ DK Zabolotnyi Institute of Microbiology and Virology of NAN, Kyiv, Ukraine.

E-mail: yatsyna@gmail.com

According to ICS, hyperactive urinary bladder syndrome is among the 10 most common diseases, with amount of 100 million people in the world whom are ill, and is ahead in the frequency of diseases of diabetes mellitus, stomach ulcer and duodenal ulcer

By expenditure, this disease is in the fifth place after arthritis, urinary incontinence and osteoporosis. Costs of GAMP are comparable to the cost of treatment for asthma and osteoporosis. Treatment of GAMP is necessary in all cases where the available symptoms cause a decrease in the quality of life of the patient. Taking into account the significant negative influence of GAMP on the quality of life of patients, it is possible to appoint therapeutic measures before the completion of all diagnostic procedures.

Since the exact causes of development and pathogenesis of GAMP are still not fully established, treatment of these patients remains largely symptomatic. Preparations of choice in treating GAMP are M-cholinoblockers. The use of M-cholin blockers in GAMP can reduce the frequency of urination, reduce the number of episodes of incontinence, increase the functional capacity of the bladder. There is also information on the promising use of flavonoids in the treatment of GAMP, including some methods are protected by the patent for the invention.

Taking into account not fully learned reason of development and pathogenesis of GAMP, it is promising to use combined drugs therapy with multi-directional mechanisms of action. The purpose of our work was to investigate the qualitative and quantitative indices of the adenylate system of erythrocytes of rats with hyperactive urinary bladder in its correction with testosterone / estradiol compositions with quercetin.

The influence of sex hormones (testosterone, estradiol) composition with quercetin on the qualitative and quantitative compound of adenile nucleotides of erythrocytes of rats with medicamentally produced, by our own methods, syndrome of hyperactive urinary bladder (HAUB) was studied.

It was defined that the HAUB course in experimental animals is accompanied by a probable decrease in the content of adenosine-triphosphate (ATP) to 14.69 % from the total number of adenile nucleotides against 58.6 % in intact with simultaneous increase of adenosine-diphosphate (ADP) to 74.65 % against 14.09 %, respectively.

It was established that the course of GASM in experimental animals was accompanied by a significant imbalance of the adenylate system of erythrocytes, due to a decrease in the content of ATP and an increase in the content of ADP in erythrocytes, indicating the development of violations of biosynthetic processes

The objective confirmation of the synergistic effect of sex hormones and bioflavonoids in the correction of functional disorders in cases of HAUB by increasing the compensatory mechanisms of cellular energy conservation has been received.

It has been substantiated that in the mechanism of development of HAUB significant importance belongs to the imbalance of the adenilate system of erythrocytes.

Key words: energetic profile, hyperactive urinary bladder, composition, testosterone, estradiol, quercetin.