

УДК 575

А.В. Беляева,
аспирант, младший научный сотрудник
ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»;

И.С. Дорофеенко,
младший научный сотрудник
ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»;

М.В. Анисович,
младший научный сотрудник
ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»;

А.К. Власенко,
младший научный сотрудник
ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»;

В.Б. Сазанов,
кандидат сельскохозяйственных наук,
ведущий научный сотрудник
ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»;

В.Ю. Афонин,
кандидат биологических наук,
заведующий лабораторией фармакогенетики
ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОМПОЗИЦИИ КАНДЕСАРТАНА С РЕСВЕРАТРОЛОМ

Введение. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одними из самых распространенных в современном мире. Это заболевания, обусловленные нарушением нормального функционирования сердца и сосудов. В настоящее время ССЗ стали основной причиной смертности населения во многих экономически развитых странах, причем в последнее время наблюдается тенденция к развитию патологий у более молодой части населения. В связи с этим исследование данной проблемы является актуальным во всем мире.

Известно, что большие длительные физические нагрузки у лабораторных животных, такие как плавание, бег, могут стать причиной развития гипертрофии сердечной мышцы, а также нарушения сердечного ритма [1, с. 1751–1759; 2, с. 1301–1309].

Кандесартан цилексетил является антагонистом рецепторов ангиотензина II и применяется в качестве антигипертензивного средства длительного действия. Введение данного препарата способствует улучшению работы сердечной мышцы. Кандесартан повышает выносливость при физических нагрузках у лю-

дей, страдающих гипертонией [3, с. 192–200]. Однако этот препарат обладает рядом побочных эффектов со стороны центральной нервной системы: отмечается головокружение, слабость, головная боль. Также существуют данные, что высокие дозы кандесартана угнетают процессы формирования отдельных субпопуляций клеток в костном мозге [4, с. 179–187]. В связи с этим были исследованы композиции кандесартана с более безопасным ресвератролом с целью снижения токсического воздействия первого на организм. Также в ходе проведения работы мы рассмотрели влияние физических нагрузок на изменение основных параметров клеточного цикла.

Материалы и методы. Для изучения влияния кандесартана и ресвератрола на молекулярно-биологические параметры костного мозга [5, с. 1467–1474; 6, с. 171–180; 7, с. 1427–1434] были взяты мыши линии C57Bl/6 весом 20–25 г (самцы). Экспериментальных животных разделили на 4 группы. Мышам 3-х групп вводили кандесартан и ресвератрол в течение 7 недель: группе 1 и 2 вводили кандесартан в дозах 3 мг/кг и 1,5 мг/кг

соответственно, животные группы 3 получали кандесартан в дозе 1,5 мг/кг и ресвератрол в дозе 1 мг/кг, а мышам контрольной группы вводили 1-процентный раствор крахмала.

На следующем этапе работы были взяты мыши линии Balb/C весом 20–25 г (самцы) для изучения влияния кандесартана и ресвератрола на молекулярно-биологические параметры костного мозга при физических нагрузках. Животных разделили на 8 групп. Мыши контрольной группы 0 использовались для получения исходных данных до начала эксперимента (осенью). Животные шести групп подвергались чрезмерным физическим нагрузкам: плаванию с 2-процентным грузом на выносливость в течение 2 месяцев, в то время как контрольная группа 1 оставалась интактной. Далее мышам 1–5 групп ежедневно вводили кандесартан и ресвератрол в различных дозировках и комбинациях в течение 4 недель: группе 1 и 2 вводили кандесартан в дозах 3 мг/кг и 1,5 мг/кг соответственно. Мыши группы 3 получали кандесартан в дозе 1,5 мг/кг и ресвератрол в дозе 10 мг/кг; животные группы 4 получали кандесартан в дозе 1,5 мг/кг и ресвератрол в дозе 30 мг/кг, а мыши группы 5 – кандесартан в дозе 1,5 мг/кг и ресвератрол в дозе 50 мг/кг.

Также исследовали влияние чрезмерных физических нагрузок на параметры клеточного цикла костного мозга мышей, изучали количество апоптотических клеток и микроядер в кроветворном органе.

В ходе дальнейшего выполнения работы был проведен анализ сезонных влияний на клеточный цикл у животных. Для этого использовали мышей линии Balb/C весом 20–25 г (самцы), которых изучали осенью (контрольная группа 0) и в конце зимы (контрольная группа 1).

С помощью проточной цитометрии в костном мозге экспериментальных животных на основании гистограмм распределения ДНК в клетках изучали процент апоптоза, количество микроядер и клеток в G1, S, G2/M фазах клеточного цикла.

Анализ содержания ДНК проводили в клетках, предварительно фиксированных в этаноле. Образцы клеток отмывали дважды ФСБ (фосфатно-солевым буфером), фиксировали в охлажденном этаноле (70 %) и хранили при -20°C до проведения эксперимента. Фиксированные в этаноле клетки отмывали ФСБ, обрабатывали раствором РНКазы (150 Ед/мл) и окрашивали раствором PI (пропидиум иодид, 50 мкг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем образцы анализировались с помощью цитометрического ана-

лиза (использовали проточный цитофлуориметр Cytomics FC 500 «Beckman Coulter», США).

Количество апоптотических клеток рассчитывали на основании измерения гиподиплоидной ДНК, окрашенной иодистым пропидием (50 мкг/мл). Регистрировали апоптотические клетки с содержанием ДНК менее 2n.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Excel.

Результаты. В последнее время исследователи уделяют большое внимание изучению комплексов препаратов с целью получения новых данных о комбинированном действии лекарств, а также более эффективного их использования. В Российской Федерации изучаются такие фармацевтические композиции с ресвератролом, как комбинация ресвератрола и симвастатина (фармакологическая группа – статины) для создания препарата с гипохолестеринемическим действием, комбинация ресвератрола с эналаприлом (фармакологическая группа – ингибиторы АПФ) для разработки препарата, обладающего остеопротективным действием [8, с. 32–35; 9, с. 239–244]. Также проводятся исследования эндотелио- и кардиопротективной активности комплекса ресвератрола с лозартаном (фармакологическая группа – антагонисты рецепторов ангиотензина II), а также с эналаприлом [10, с. 31–35].

Поскольку кандесартан цилексетил используется в медицинской практике в качестве антигипертензивного средства, но обладает большим количеством побочных эффектов, в ходе проведения работы была изучена комбинация данного препарата с более безопасным ресвератролом.

При изучении влияния выбранных веществ на процент апоптотических клеток, микроядер и клеточный цикл мышей линии C57Bl/6 были получены следующие результаты (таблица 1). Уровень апоптоза и микроядер в клеточной популяции костного мозга мышей у группы, получавшей кандесартан в дозе 3 мг/кг, был значительно выше по сравнению с контролем ($P < 0,05$). Введение же комбинации с ресвератролом привело к снижению числа апоптотических клеток и микроядер у мышей линии C57Bl/6 (таблица 1), что указывает на протекторные свойства выбранного антиоксиданта. Таким образом, нами было впервые показано, что кандесартан цилексетил приводит к увеличению в костном мозге количества апоптотических клеток. Механизм формирования клеток с данными маркерами повреждения требует дополнительного изучения.

Таблица 1 – Результаты подсчета молекулярно-биологических параметров костного мозга мышей линии C57Bl/6 при введении кандесартана и ресвератрола

Группа	% апоптоза	G1	S	G2/M	микроядра
Контроль	2,16 ± 0,26	52,23 ± 3,28	40,83 ± 2,75	6,94 ± 1,62	0,74 ± 0,08
Группа 1	6,09 ± 1,56*	57,14 ± 4,35	34,65 ± 3,43	8,22 ± 2,74	7,47 ± 3,15*
Группа 2	4,77 ± 1,72	56,04 ± 2,32	34,63 ± 3,70	9,33 ± 3,17	5,36 ± 2,81
Группа 3	1,68 ± 0,24	39,09 ± 2,49*	50,08 ± 6,38	10,84 ± 3,92	0,84 ± 0,15

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с контрольной группой (P<0,05)

Таблица 2 – Сравнение молекулярно-биологических параметров костного мозга мышей линии Balb/C на фоне введения кандесартана и ресвератрола

Группа	% апоптоза	G1	S	G2/M	микроядра
Контроль 0	0,89 ± 0,28****	85,14 ± 0,82****	11,25 ± 0,75****	3,63 ± 0,13	0,44 ± 0,09****
Контроль 1	1,25 ± 0,08****	66,34 ± 3,82	28,85 ± 4,59	4,80 ± 2,09	0,47 ± 0,10****
Контроль 2	2,55 ± 0,88*	66,5 ± 2,41*	26,02 ± 1,95*	7,49 ± 1,58*	0,55 ± 0,07
Группа 1	3,46 ± 0,60**	69,48 ± 3,26	26,53 ± 3,17	3,97 ± 0,81	2,09 ± 0,36** ***
Группа 2	4,77 ± 0,81**	65,35 ± 5,62	31,72 ± 5,75	2,92 ± 0,85	2,58 ± 0,45** ***
Группа 3	6,80 ± 1,01** ****	69,83 ± 5,05	25,81 ± 4,87	4,36 ± 0,75	3,98 ± 0,77** ***
Группа 4	5,94 ± 0,82** ****	71,19 ± 7,55	18,59 ± 8,53	10,23 ± 6,62	5,36 ± 1,37** ***
Группа 5	5,07 ± 0,84**	70,30 ± 3,83	24,78 ± 4,34	4,92 ± 1,68	3,68 ± 0,86** ***

Примечание: * – различия достоверны при сравнении с контрольной группой 0 и контрольной группой 2 (P<0,05)

** – различия достоверны при сравнении с контрольной группой 1 (P<0,05)

*** – различия достоверны при сравнении с контрольной группой 2 (P<0,05)

**** – различия достоверны при сравнении с группой 1 (P<0,05)

Результаты изучения молекулярно-биологических параметров костного мозга экспериментальных животных при длительных физических нагрузках представлены в таблице 2. В ходе проведенного нами эксперимента было показано, что у группы, подвергавшейся чрезмерным физическим нагрузкам (контроль 2), происходило увеличение процента апоптотических клеток по сравнению с контрольными группами 0 и 1, а также наблюдалось перераспределение клеток по циклу.

При изучении влияния кандесартана и ресвератрола в различных дозировках и комбинациях на молекулярно-биологические параметры костного мозга мышей линии Balb/C, подвергавшихся изнурительным физическим нагрузкам, установлено, что параметры клеточного цикла опытных групп не отличались от таковых контрольных групп (таблица 2).

В ходе выполнения данного эксперимента нами было впервые установлено, что после истощающих физических нагрузок введение кандесартана цилексетила приводит к увеличению в костном мозге количества апоптотических клеток по сравнению с контролем 1 (P<0,05).

Показано, что длительное введение комбинации изучаемых веществ приводит к достоверному увеличению количества микроядер по сравнению с контролем 1 и 2, а также к уве-

личению числа апоптотических клеток по сравнению с контролем 1 (P<0,05) (таблица 2). Комплексы кандесартана с меньшими дозами ресвератрола увеличивают уровень апоптоза по сравнению с группой, подвергавшейся физическим нагрузкам без последующего введения препаратов (P<0,05). Таким образом, происходит усиление процесса клеточной гибели в костном мозге, что, возможно, является следствием протективных свойств ресвератрола, которые проявляются в элиминации клеток с повреждениями ДНК. Полученные данные требуют дальнейшего изучения.

В ходе проведения исследований были проанализированы влияния сезонных ритмов на молекулярно-биологические параметры костного мозга животных. Показано, что сезонные ритмы значительно влияют на изменение пролиферации клеток костного мозга (таблица 2). Так, число клеток в клеточном цикле достоверно увеличивается у животных в зимне-весенний период (контроль 1) по сравнению с особями, которые анализировались в конце осени (контроль 0).

Рассмотрение цитогенетических показателей в динамике (осень – зима – весна) позволили определить некоторые физиологические рамки колебаний изучаемых нами параметров костного мозга мышей. В этой связи можно от-

метить, что действие кандесартана если и превышает контрольные показатели, то эти изменения находятся в отмеченной физиологической норме реакции организма. Возможно, более длительное действие препарата окажет негативное влияние или произойдет адаптация к его действию, что требует дальнейшего изучения.

Отметим, что ресвератрол в норме снижает цитотоксическое действие кандесартана, а протекторные свойства антиоксиданта при физических нагрузках требуют более детального изучения.

Заключение. В результате изучения воздействия кандесартана цилексетила и ресвератрола на молекулярно-биологические параметры костного мозга мышей линии C57Bl/6 нами впервые было установлено, что кандесартан приводит к увеличению количества апоптотических клеток и микроядер. Комбинирование ресвератрола с кандесартаном приводит к снижению уровня данных клеточных маркеров повреждения ДНК, что указывает на то, что выбранный антиоксидант снимает токсическое действие сартана, проявляя цитопротективные свойства.

В ходе проведения исследования на мышах линии Balb/C было установлено, что изнурительные физические нагрузки приводят к увеличению количества апоптотических клеток в костном мозге. Результаты изучения действия кандесартана цилексетила и ресвератрола в различных дозировках и комбинациях на молекулярно-биологические параметры костного мозга мышей линии Balb/C, длительно подвергавшихся изнурительным физическим нагрузкам, показали, что продолжительное воздействие кандесартана приводит к увеличению числа микроядер и апоптотических клеток, а введение комплекса данных веществ ведет к усилению цитотоксического эффекта.

Изучение влияния сезонных колебаний на клеточный цикл мышей линии Balb/C, формирование микроядер и изменение количества апоптотических клеток показало, что данные параметры зависят от времени проведения анализа. Данные о сезонных колебаниях изучаемых показателей позволяют оценивать рамки физиологической реакции организма на ксенобиотики и применять для изучения безопасности и эффективности лекарственных средств и их комбинаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Evangelista, F.S.* Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice / F.S. Evangelista, P.C. Brum, J.E. Krieger // *Braz J Med Biol Res.* – 2003. – Vol. 36, № 12. – P. 1751–1759.
2. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy / Ole Johan Kemi [et al.] // *Jappphysiol.* – 2002. – Vol. 93, № 4. – P. 1301–1309.
3. *De Rosa, M.L.* Candesartan improves maximal exercise capacity in hypertensives: results of a randomized placebo-controlled crossover trial / M.L. De Rosa, M. Chiariello // *J Clin Hypertens.* – 2009. – Vol. 11, № 4. – P. 192–200.
4. Possible mechanism for the anemia induced by candesartan cilexetil (TCV-116), an angiotensin II receptor antagonist, in rats / I. Naeshiro [et al.] // *Eur J Pharmacol.* <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9754919>> – 1998. – Vol. 354, № 2/3. – P. 179–187.
5. Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression / Yi Zheng [et al.] // *Mol Vis.* – 2010. – Vol. 16. – P. 1467–1474.
6. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage / A. Sgambato [et al.] // – 2001. – Vol. 496, № 1/2. – P. 171–180.
7. Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging / Nicole Schupp [et al.] // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2007. – Vol. 292. – P. 1427–1434.
8. *Тимошенко, Е.Ю.* Разработка состава модельной смеси для получения препарата с гипохолестеринемическим действием / Е.Ю. Тимошенко, Д.И. Писарев, О.В. Воронкова // *Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация.* – 2010. – № 22 (93). – С. 32–36.
9. *Файтельсон, А.В.* Фармакологическая коррекция экспериментального остеопороза комбинацией резвератрола с эналаприлом / А.В. Файтельсон // *Научные ведомости. Серия медицина. Фармация.* – 2012. – № 4 (123). – С. 239–244.
10. К вопросу фармакологической коррекции гипострогениндуцированной эндотелиальной дисфункции / М.В. Корокин [и др.] // *Человек и его здоровье.* – 2008. – № 1. – С. 31–35.

SUMMARY

Currently, cardiovascular diseases are highly prevalent in the world. In this regard, it is important to create new drugs and their combinations for the treatment of cardiovascular diseases. The complex of drugs such as candesartan cilexetil and resveratrol is studied in this work. The results of the experimental study of the influence of physical training and selected substances on the molecular-biological parameters of bone marrow in mice C57Bl/6 and Balb/C are presented. It is shown that the number of apoptotic cells in the bone marrow increases after physical exercises (swimming). The administration of candesartan and resveratrol leads to the significant change of the main molecular-biological parameters of bone marrow of mice. Also the influences of seasonal fluctuations on the cell cycle of animals were studied in this work.

Поступила в редакцию 23.01.2013 г.