

УДК 001.893.54:615.32:615.357:577.115

ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ЛІКАРСЬКОГО РОСЛИННОГО ЗБОРУ НА МОДЕЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ОВАРІОЕКТОМІЇ У ЩУРІВ

Коноваленко І. С., Половко Н. П., Загайко А. Л., Литкін Д. В.

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Вступ. Природні процеси старіння призводять до фізіологічних змін у мозку та ендокринній системі всіх організмів. Менопауза настає, коли менструальний цикл припиняється через ановуляції, і підтверджується ретроспективно після одного року аменореї. Початок менопаузального переходу і подальшої пост-репродуктивної стадії життя супроводжується різноманітними фізіологічними, поведінковими і мозковими змінами, які можуть вплинути на якість життя [1]. Багато факторів ризику для здоров'я змінюються з віком і після менопаузи, включаючи, крім іншого, підвищений ризик серцево-судинних захворювань, остеопорозу, раку, збільшення ваги, діабету, інсульту, сексуальної дисфункції, афективних розладів, порушень сну і зниження когнітивних функцій [2]. У зв'язку з цим актуальним є пошук альтернативних методів лікування клімактеричного синдрому, в тому числі препаратів рослинного походження. Препарати, до складу яких входить лікарська рослинна сировина, мають широкий спектр фармакологічної активності за рахунок поєднання в їх складі різних груп біологічно активних речовин, мають незначний ризик виникнення алергічних реакцій, м'яку дію та проявляють невеликий спектр побічних явищ.

Мета дослідження. Провести фармакологічні дослідження методом експериментальної оваріоектомії на самицях щурів з визначенням впливу розробленого збору на рівень обміну ліпідів та гормонів у крові досліджуваних тварин.

Методи дослідження. Об'єктом дослідження був збір з лікарської рослинної сировини. Методом експериментальної оваріоектомії визначали вплив настою, отриманого з рослинного збору на рівень обміну ліпідів та гормонів у самиць щурів. Оваріоектомія або хірургічне видалення яєчників є стандартом в доклінічній області для оцінки ефектів гормонального фону на моделях самок тварин. Процедура полягає в двосторонньому висіченні яєчників, яйцепроводів (маткових труб) і кінчиків рогів матки з черевної порожнини, залишаючи роги матки недоторканими.

В якості препарату-порівняння використовували зареєстрований на ринку України препарат рослинного походження Клімапін (ХФЗ Червона зірка, Україна). Краплі оральні містять в своєму складі настойку суміші лікарської рослинної сировини (1:10) (екстрагент – етанол 40 %): *Crataegi fructus* (глоду плоди) – 3 г; *Lupuli strobili* (хмелю шишки) – 2 г; *Leonuri cardiacaе herba* (собачої кропиви трава) – 1,5 г; *Urticae folia* (кропиви листя) – 1 г; *Salviae officinalis folium* (шавлії листя) – 1,5 г; *Origanum vulgare herba* (материнки трава) – 0,5 г; *Belladonnae folia* (беладонни листя) – 0,5 г на 100 мл препарату. Даний препарат під АТС-кодом N05CM «Снодійні та седативні препарати», показаний для застосування при порушеннях вегето-судинної дистонії за гіпертонічним зразком та регуляції

серцевої діяльності при гіпертонічній хворобі I ступеня та у предменопаузальному і менопаузальному періодах у час припливів та потовиділення; легкого та помірного безсоння неорганічного характеру у людей різного віку; астено-невротичного синдрому або нейроциркуляторної дистонії; для регулювання нейропсихічного статусу при психоемоційному навантаженні [3].

Другим референтним засобом в експериментальному дослідженні використовували зареєстрований на ринку України препарат рослинного походження Тазалок у формі крапель оральних, отриманих 40% етанолом у співвідношенні 1:10 (ТОВ «Універсальне агентство «Про-Фарма», Україна). До складу лікарського засобу входить суміш лікарської рослинної сировини: коренів лабазнику шестипелюсткового – 0,28 г, коренів петрушки кучерявої свіжих – 0,225 г, коренів селери свіжих – 0,17 г, трави підмареннику справжнього – 0,135 г, трави льонку звичайного – 0,11 г, квіток нагідок – 0,08 г на 10 мл препарату. Даний безрецептурний препарат відноситься до такої групи класифікації АТС-кодом G02C – «Інші засоби, що застосовуються в гінекології». У показаннях для застосування може використовуватися при порушеннях менструального циклу, передменструальному синдромі, альгодисменореї, дисменореї, фіброзно-кістозної мастопатії, ретенційній кісти яєчників. Препарат показаний й у складі комплексної терапії при гіперплазії ендометрія, фіброміомі матки, ендометріозі, синдромі полікістозних яєчників та призначаються при клімактеричних розладах [4].

Експеримент проводили на 50 білих аутбредних самицях щурів одного віку (приблизно 7 місяців) з масою тіла 205-235 г. Піддослідні тварини утримувались у віварії згідно зі стандартними санітарними нормами та рекомендованими умовами на необхідному харчовому раціоні [5].

Вміст ліпідів (тригліцериди, загальний холестерин, холестерин ліпопротеїдів низької щільності, холестерин ліпопротеїдів високої щільності) в сироватці крові вимірювали ферментативним методом за допомогою стандартних наборів реактивів Тригліцериди Ф НР022.02, Холестерин Ф НР026.02, Холестерин-HDL Ф НР026.04 й Холестерин-LDL Ф НР026.05 (ТОВ НВП «Філісіт-Діагностика», Україна) згідно відповідним інструкціям до застосування.

Аналіз вмісту статевих гормонів (естрадіол, прогестерон) в сироватці крові щурів проводили імуноферментним методом на імуноферментному аналізаторі Stat Fax 303 plus (Awareness Technology, США) із застосуванням стандартних наборів реактивів «Естрадіол-ІФА» й «Прогестерон-ІФА» (ТОВ «ХЕМА», Україна).

Усі дослідження проводились у відповідності з директивою Ради ЄС 86/609 ЄЕС від 24 листопада 1986 р. про дотримання законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментальної та іншої наукової мети [6].

Отримані результати статистично оброблялися із використанням методу однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA за допомогою стандартного пакету комп'ютерної програми STATISTICA 7.0 та статистико-логістичним

методом 4P1 за допомогою інтернет-сервісу для вільного використання MyAssays® [7].

У ході дослідження тварин зважували та розподіляли по групах – по 10 тварин в кожній, після чого групам присвоювали шифр:

1. несправжньооперовані тварини (НО);
2. тварини з модельною патологією, у яких відтворювали експериментальну оваріоектомію (МП) без медикаментозного лікування;
3. тварини, у яких відтворювали експериментальну оваріоектомію та проводили лікування досліджуваним тест-зразком настоєм отриманим зі збору комбінованого складу (НКС);
4. тварини, у яких відтворювали експериментальну оваріоектомію та проводили лікування референтним-зразком краплями Клімапін (РТ 1);
5. тварини, у яких відтворювали експериментальну оваріоектомію та проводили лікування референтним-зразком краплями Тазалок (РТ 2).

Для моделювання у тварин стану, який може бути еквівалентним клімактеричному синдрому у жінок, застосовували хірургічну методику видалення яєчників - білатеральну оваріоектомію по Кіршенблату. Експериментальну оваріоектомію піддослідних тварин проводили в асептичних умовах під хлороформним наркозом. Несправжньооперованим тваринам проводили розтин і ушивання рани без видалення яєчників.

Основні результати.

Метаболічні розлади, що виникають при клімактеричному синдромі, в першу чергу є наслідками порушення гормональної регуляції на ланки обміну ліпідів й вуглеводів. Клімактеричний синдром у жінок частіше за все асоційований з порушенням толерантності до гормонів (естрадіол та прогестерон) та ліпопротеїдів низької та високої щільності, що відповідає патогенезу метаболічного синдрому та збільшує ризик смертності від серцево-судинних захворювань у жінок. В рамках дослідження впливу тест-зразку на корекцію метаболічних розладів вивчали ліпідограму сироватки крові у оваріоектомованих самиць щурів. В рамках цього етапу досліджування у тварин вимірювали рівень тригліцеридів (ТГ), загальний холестерол (ЗХ), холестерол ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ-Х), холестерол ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ-Х).

У тварин, в яких були видалені яєчники, відмічалось значуще збільшення вмісту ТГ, ЗХ й ЛПНЩ-Х в сироватці крові. При цьому показник ЛПВЩ-Х трохи зменшувався, але зміна була не вірогідною ($p > 0,05$) (табл. 1).

Під впливом курсового лікування тест-зразком НКС у оваріоектомованих самиць щурів спостерігалось статистично помітне зменшення рівня загального холестеролу на 12,7% без вагомої зміни різних його фракцій (табл. 1).

Застосування референтного зразку РТ1 не змінювало вміст ТГ й ЗХ, малає незначне збільшення рівня ЛПВЩ-Х (табл. 1). При застосуванні референтного зразку РТ2 вміст ТГ й ЗХ не змінювався також, але певним чином впливало на розподіл фракцій холестеролу, вірогідно зменшуючи рівень ЛПНЩ-Х на 18,6% у порівнянні з цим значенням в групі КП ($p \leq 0,05$). Також було помічено незначна

тенденція до збільшення рівня ЛПВЩ-Х, проте й статистично не значуща ($p > 0,05$).

В ході даного етапу дослідження був показаний певний помірний вплив досліджуваного зразка на прояви дисліпідемії у оваріоектомованих самиць щурів.

Таблиця 1

Маркери обміну ліпідів в сироватці крові самиць щурів після 21-го лікування досліджуваним тест-зразком за умов експериментальної оваріоектомії ($\bar{X} \pm S_x$, $n=10$)

Експериментальна група	ТГ (мг/дл)	ЗХ (мг/дл)	ЛПНЩ-Х (мг/дл)	ЛПВЩ-Х (мг/дл)
ЛО	79,3±5,6	152,5±8,3	69,8±8,1	58,1±5,7
КП	112,5±9,4*	205,7±10,2*	130,4±9,5*	47,3±4,9
НКС	95,8±3,8*	179,8±6,4*/**	111,4±8,6*	47,6±6,2
РТ1	99,3±1,3*	199,9±6,4*	108,1±5,5*/**	66,2±7,7
РТ2	97,6±6,7*	198,3±11,3*	106,1±6,5*/**	64,2±8,5

Примітки:

- 1) * – відмінності вірогідні відносно тварин групи інтактного контролю ($p \leq 0,05$);
- 2) ** – відмінності вірогідні відносно тварин групи контрольної патології ($p \leq 0,05$).

Після видалення яєчників рівень естрадіолу й прогестерону в сироватці крові щурів вірогідно зменшувалися, що вказує на безпомилково проведені хірургічні маніпуляції й релевантно відтворену експериментальну модель (табл. 2).

Дані імуноферментного дослідження стосовно вмісту статевих гормонів в крові прооперованих щурів, що отримували експериментальні й референтний зразки, продемонстрували, що не один з фармакологічних засобів вірогідно не змінював рівень естрадіолу й прогестерону у порівнянні з аналогічними показниками в групі контрольної патології ($p > 0,05$) (табл. 2).

Дані цього етапу дослідження вказують на те, що тест-зразок не збільшував вміст вимірюваних статевих гормонів в крові оваріоектомованих тварин. Це може вказувати на те, що експериментальні засоби не викликають збільшення периферійної ароматазної активності й гіперфункції наднирників, що є позитивною токсикологічною характеристикою. Враховуючи літературні дані щодо фітохімічного складу рослинної сировини (фітоестрогени), використаної при розробці препаратів, а також помірні позитивні результати попередніх етапів дослідження, можна зробити гіпотезу, що дані тест-зразки корегують прояви гіпоестрогенового стану (експериментальної оваріоектомії) шляхом прямої взаємодії з естрогеновими рецепторами, й істотно не впливають на синтез естрогенів в організмі.

Рівень статевих гормонів в сироватці крові самиць щурів після 21-го лікування досліджуваними тест-зразками за умов експериментальної оваріоектомії ($\bar{X} \pm S_x$, n=10)

Експериментальна група	Рівень естрадіолу, пг/мл	Рівень прогестерону, пг/мл
ЛО	49,6±4,8	22,8±4,4
КП	22,3±3,2*	8,3±1,4*
НКС	23,8±3,7*	10,9±1,1*
РТ1	19,8±3,7*	7,4±1,3*
РТ2	22,9±3,7*	10,1±2,1*

Примітки:

- 1) * – відмінності вірогідні відносно тварин групи інтактного контролю ($p \leq 0,05$);
- 2) ** – відмінності вірогідні відносно тварин групи контрольної патології ($p \leq 0,05$).

Висновки. Тест-зразок настій з лікарської рослинної сировини комбінованого складу, в даному лікувальному режимі мав задовільну активність на ліпідний та гормональний обмін у самиць щурів, яким була проведена модель експериментальної оваріоектомії у порівнянні з референтними препаратами Клімапін (РТ 1) та Тазалок (РТ 2). Розроблений збір є актуальним для подальших дослідженнях для корекції клімактеричних розладів у жінок.

Список літератури

1. Al-Safi Z, Santoro N. Menopausal hormone therapy and menopausal symptoms. *Fertil Steril.* 2014;101:905–915.
2. Neves-e-Castro M, Birkhauser M, Samsioe G, Lambrinoudaki I, Palacios S, Borrego R, et al. EMAS position statement: the ten point guide to the integral management of menopausal health. *Maturitas.* 2015;81:88–92.
3. Клімапін™ URL: <https://compendium.com.ua/info/172102/klimapin/>
4. Тазалок™ URL: <https://compendium.com.ua/info/171674/tazalok-/>
5. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. К.: Державний фармакологічний центр МОЗ України, 2002. 155 с.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose : Council of Europe. Strasbourg, 1986. – 52 p.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. 3-е изд. М.: МедиаСфера, 2006. 312 с.