МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ТЕХНОЛОГІЙ ТА ДИЗАЙНУ

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Факультет хімічних та біофармацевтичних технологій \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(повне найменування інституту, назва факультету )

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Кафедра промислової фармації \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(повна назва випускової кафедри)

РЕФЕРАТ

до дипломної магістерської роботи

на тему

«Обґрунтування доцільності застосування біофлавоноїдів для створення лікарських засобів з кардіопротекторними властивостями»

Виконав: студент групи\_\_ МгХФ-19 \_

спеціальності

\_«Фармація, промислова фармація»\_\_

(шифр і назва спеціальності)

 Петруненко І.В.\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(прізвище та ініціали)

Керівник \_\_ Кулик В.Б.\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

(прізвище та ініціали)

Рецензент Пальчевська Т.А.

(прізвище та ініціали)

Київ – 2020

**Актуальність теми.**

Незважаючи на впровадження в медичну практику нових лікарських препаратів спостерігається зростання числа захворювань, пов'язаних з ішемічною хворобою серця (ІХС). Прояв судинного спазму залишається однією з головних причин розвитку інфаркту міокарда та інсульту, які найбільш важко протікають на тлі гіпертонічної хвороби, яка виявляється у 20-30% дорослого населення промислово розвинених країн світу, та близько 40% в мешканців України.

Розуміння фундаментальної ролі гіпоксії і пероксидації в генезі багатьох серцево-судинних захворювань стимулювало розробку засобів, здатних підвищувати енергопродукуючі функції клітин. Розвиток гіпоксії негативно впливає на метаболізм ендотеліоцитів, що сприяє дисфункції ендотелію артеріальної стінки і розвитку атеросклерозу, посилюючи перебіг гіпоксії. Для лікування захворювань серцево-судинної системи в даний час застосовується цілий арсенал антигіпертензивних, антиангінальних та антигіпоксичних засобів, що впливають на ендотелій судин. Можливими механізмами дії флавоноїдів на судинне русло є вплив на систему оксиду азоту (збільшення експресії або активація ендотеліальної синтази оксиду азоту (eNOS), відновлення основного коферменту eNOS – тетрагідробіоптерину, запобігання переходу NO в пероксинітрит, а також вплив на ендотеліальні фактори (EDHF, PGI2 і ін.), фактори згортання крові, позаклітинний матрикс (гіалуронова кислота, колаген і ін.), молекули адгезії і клітинні контакти (CD31). Перераховані механізми тісно пов'язані з регуляцією тонусу судин і впливом на артеріальний тиск. Тому застосування фітопрепаратів для лікування гіпертонічної хвороби та патологій серця широко представлено в медицині різних країн. Разом з тим, як і раніше актуальним є вивчення ефективності, механізмів дії і безпеки препаратів природного походження.

Мета дослідження. Оцінка фармакологічної активності ряду рослинних екстрактів, окремих флавоноїдів і флавоноїдвмісних препаратів на моделях патології серцево-судинної системи, а також встановлення механізмів їх кардіопротекторної дії.

**Об’єкт дослідження** – кардіопротекторна дія окремих флавоноїдів і флавоноїдвмісних препаратів рослинного походження.

**Предмет дослідження** – ефективність фармацевтичних субстанцій групи біофлавоноїдів з кардіопротекторними властивостями.

Для досягнення мети і розв’язання поставлених завдань використано такі **методи дослідження**: біохімічні, фармакологічні, фізіологічні, статистичні.

**Основні конструктивні, технологічні та інші характеристики та показники.**

Проведено експериментальне обґрунтування профілактичного і лікувального застосування флавоноїдів при експериментальному інфаркті міокарда. Дана комплексна оцінка флавоноїдів, які представляють різні класи, щодо їх відновлюючих, антирадикальних і хелатуючих властивостей при ініціації вільнорадикального окислення. Отримано нові дані про антиоксидантну активність флавоноїдів з урахуванням їх функціональної взаємодії з компонентами ендогенної антиоксидантної системи та іншими біологічно активними сполуками з урахуванням проявів синергізму, адитивності і антагонізму. На моделях розвитку макро- і мікроангіопатій вивчено вплив флавоноїдів і флавоноїдвмісних субстанцій на ендотеліальну дисфункцію, яка супроводжувалася потовщенням інтими судин, зниженням відносної кількості перицитів в ендотелії. На прикладі індивідуальних флавоноїдвмісних субстанцій та їх комбінацій з аскорбіновою кислотою розкрито основні механізми дії і мішені вазо- і кардіопротекторну дії цього класу біологічно активних сполук.

**Отримані результати.**

***Вплив флавоноїдвмісних екстрактів на розвиток експериментального інфаркту міокарда***

Із застосуванням ЕКГ та під контролем ряду біохімічних показників плазми крові було проведено оцінку ефективності профілактичного введення сухих водних екстрактів хмелю звичайного, кедра сибірського, родіоли рожевої і ромашки аптечної при експериментальному інфаркті міокарда (ЕІМ), викликаному перев'язкою лівої вінцевої артерії у нелінійних білих щурів-самців масою 180-200 г та віком 3,5 місяці.

У всіх експериментальних групах тварин перев'язка лівої вінцевої артерії викликала значні зміни на ЕКГ, реєстрували через 1 годину: спостерігалося істотне зниження ЧСС на 30-36%, інтервал QТ був збільшений порівняно з інтактними тваринами приблизно в 1,3 рази, інтервал РQ був збільшений в порівнянні з інтактними тваринами приблизно в 1,2 рази. Разом з тим дія досліджуваних екстрактів на тлі експериментального інфаркту міокарда (ЕІМ) істотно не впливала на зміну параметрів ЕКГ.

Введення екстракту хмелю супроводжувалося змінами ЕКГ: у 86% тварин відзначали підйом інтервалу SТ, середня величина підйому 1,4 ± 0,18 мм. У 14% щурів в даній групі, було зареєструвано аритмію за типом атріовентрикулярної дисоціації. Використання екстракту кедра призвело до зниження кількості щурів з наявністю в ЕКГ «котячої спинки» на 29% в порівнянні з попередніми групами. Введення препаратів родіоли і ромашки викликало зниження числа експериментальних тварин з підйомом інтервалу SТ (на 42 і 48%, відповідно), однак середня величина підйому не відрізнялася від даного показника в інших групах. Слід зазначити, що в групі тварин, які отримували екстракт ромашки, відсоток аритмій був вище (в 2,5 рази), ніж у тварин, які отримували інші препарати.

Через 7 днів після гострого експериментального інфаркту міокарда середня величина підйому сегмента SТ в контрольній групі істотно знизилася, також як і в групі тварин, які отримували екстракт ромашки аптечної і екстракт хмелю звичайного. У групі тварин, які отримували екстракт кедра сибірського, у 33% тварин зареєстрована аритмія такого ж характеру, що і раніше, але менш виражена за ступенем брадикардії.

На тлі розвитку ЕІМ спостерігалися ознаки синдрому цитолізу в міокарді: збільшення АЛТ, ACT і ЛДГ в плазмі крові. Найбільш ефективною цитопротекторною дією володіє екстракт ромашки, на тлі застосування якого спостерігалося значиме зниження активності АЛТ, ACT і ЛДГ. Наступними за ефективністю виявилися екстракт хмелю і родіоли. Екстракт кедра був найменш ефективний за цими показниками. Попередження пошкодження мембран кардіоміоцитів можливо пов’язане з вираженою антиоксидантною дією досліджуваних речовин. Так, нормалізація активності каталази і ПОЛ в крові спостерігалася під впливом екстрактів ромашки і кедра, екстракти хмелю і родіоли виявилися ефективними тільки відносно ПОЛ і не чинили впливу на активність каталази.

Також, на тлі експериментального інфаркту спостерігалося зниження концентрації відновленого глутатіону, збільшення вмісту МДА, і зниження активності каталази в тканинах серця. Екстракт ромашки за цими показниками був найбільш ефективний, наступним за ефективністю виявився екстракт родіоли. Екстракти хмелю і кедра вираженого ефекту на ці показники не мали.

Важливо відзначити, що з п'яти досліджених речовин тільки екстракти родіоли і ромашки володіли системною антиоксидантною дією, нормалізували показники антиоксидантного статусу (МДА, GSH, каталаза), як в крові, так і локально на рівні кардіоміоцитів.

При розвитку ЕІМ також фіксували порушення процесів тканинного дихання і метаболізму в міокарді: знижувалися запаси АТФ, глікогену; підвищувався вміст недоокислених продуктів обміну – молочної кислоти. Найбільш вираженим позитивним ефектом мав екстракт ромашки, який нормалізував дані показники. Екстракти хмелю і родіоли володіли схожим ефектом, також впливали на нормалізацію процесів тканинного дихання, проте рівня показників інтактних тварин досягнуто не було. Слабким ефектом відносно цих показників володів екстракт кедра.

***Гістологічні зміни в міокарді***

Через 24 години після перев'язки лівої вінцевої артерії в міокарді лівого шлуночка щурів контрольної групи спостерігалися загальні розлади кровообігу у вигляді повнокров'я, невеликих крововиливів, стазів крові в капілярах, набряку. На 3-й добу після операції в зоні ішемії спостерігалося формування інфаркту. Розлад кровообігу носив вже не загальний, а місцевий характер. Некротизовані кардіоміоцити були позбавлені поперечної смугастості ядер, гомогенно зафарбовувалися еозином. У зоні некрозу перебували гемолізовані еритроцити, поліморфноядерні лейкоцити. Лейкоцитарна інфільтрація спостерігалася в основному навколо вогнища некрозу. Строма міокарда поза зоною некрозу була набряклою. На 7-ий день спостерігалася організація інфаркту, розсмоктування некротизованих волокон і заміщення ділянок некрозу молодою сполучною тканиною, багатою на клітинні елементи переважно фібробластичного ряду. У більш пізні терміни на місці цих вогнищ проліферації клітин фібробластичного ряду утворювався фіброзний рубець.

Аналогічні зміни спостерігалися в групах тварин, які отримували екстракти хмелю і кедра. При введенні екстрактів родіоли і ромашки щурам через 24 години після операції загальні розлади кровообігу в міокарді лівого шлуночка серця були менш виражені в порівнянні з контрольними тваринами. В ділянці ішемії спостерігалася еозинофілія м’язових волокон і невеликий набряк. На третю добу спостерігалося формування інфаркту міокарда, переважно під епікардом передньої стінки лівого шлуночка. Розміри вогнища некрозу були значно менші, ніж у контрольних щурів. Некротизовані волокна були блідо пофарбовані, позбавлені смугастості і ядер. В осередку некрозу спостерігався набряк, невелика кількість гемолізованих еритроцитів і лейкоцитів. Лейкоцитарна інфільтрація навколо вогнища некрозу була слабо виражена. На 7-добу на місці некротизованих волокон спостерігалася проліферативна реакція строми з великою кількістю клітин фібробластичного ряду. Розміри ділянки проліферації були менші порівняно з контролем.

Таким чином, на моделі експериментального інфаркту міокарда встановлено, що екстракт хмелю звичайного частково захищав кардіоміоцити від цитолізу, за показниками АЛТ, АСТ і ЛДГ, однак екстракт не мав вираженого ефекту на перебіг інфаркту міокарда, і не володів антиоксидантними властивостями.

Екстракт насіння кедра сибірського надавав кардіопротекторну дію в гострому періоді інфаркту міокарда, знижуючи кількість тварин з ЕКГ-ознаками інфаркту і частково захищаючи кардіоміоцити від цитолізу, найбільш ймовірно цей ефект пов'язаний з ендотелій-протекторним механізмом. Цікаво відзначити ефект екстракту родіоли рожевої на моделі циркуляторної гіпоксії серця, де екстракт знижував частоту підйому сегмента SТ, надавав антиаритмічну дію, попереджав цитоліз кардіоміоцитів, істотно знижував розміри вогнища некрозу. На моделі циркуляторної гіпоксії серця застосування екстракту ромашки призводило до різкого зниження кількості тварин з підйомом SТ вже до 3-ї доби після ішемічного ушкодження, а до 7-ї доби екстракт повністю нормалізував цей показник, проте не запобігав розвитку аритмій. Екстракт мав виражені антиоксидантні властивості, запобігав цитолізу кардіоміоцитів, накопичення молочної кислоти і зниження запасів глікогену і АТФ у міокарді. Таким чином, екстракти родіоли рожевої і ромашки аптечної є найбільш перспективними щодо профілактики ішемічної хвороби серця і запобігання її ускладнень, однак уточнення механізму дії і визначення основних фармакологічних ефектів потребує більш поглиблених досліджень.

***Вплив флавоноїдів і аскорбінової кислоти на ендотеліальний фактор NO‑синтазу (eNOS) при гострому пошкодженні ендотелію***

На тлі оксидативного стресу відбувається накопичення токсичних продуктів в результаті деструкції білків і нуклеотидів, а також ПОЛ. При тривалому оксидативному стресі відбувається виснаження антиоксидантної системи, активація транскрипційних факторів, гіперактивація апоптозу, порушення синтезу простаноїдів і медіаторів згортання крові.

При гістологічному дослідженні встановлено, що вплив комбінації аскорбінової кислоти і біофлавоноїду рутину (АР) в якості капіляропротекторного засобу, спостерігалося зниження вираженості ПОЛ. Пошкодження ендотелію судин істотно зменшувалося при застосуванні АР. Найбільш виражений вплив АР на ендотелій легеневої артерії і ендокарда лівого і правого шлуночків спостерігали в дозах 50 і 100 мг/кг. Позитивну дію відмічали відносно експресії eNOS в серці, легенях і аорті. Таким чином, у комбінації АР встановлені антиоксидантні властивості, вплив на eNOS і протинабрякову дію на ендотелій судин.

При застосуванні комбінації аскорбінової кислоти і біофлавоноїду таксифоліну (АТ) у всіх досліджуваних дозах в крові спостерігалося виражене зниження інтенсивності ПОЛ до рівня інтактних тварин, а також зниження активності каталази.

Пошкодження ендотелію судин істотно зменшувалося і при застосуванні AT. Найбільш виражений вплив AT був здійснений на ендотелій ендокарда лівого і правого шлуночків, а також аорти. Під впливом комбінації знижувалася товщина інтими судин серця і аорти. Препарат надав найбільш виражену дію в дозах 100 і 200 мг / кг. Позитивна дія спостерігалася відносно експресії eNOS в серці і аорті. В цілому, AT мав антиоксидантну, протинабрякову дію і позитивно впливав на експресію eNOS. Максимально виражений ефект був при застосуванні AT в дозі 100 мг / кг.

***Взаємодія флавоноїдів з іншими антиоксидантами***

Алгоритм оцінки сумарної антирадикальної активності (АРА) досліджуваних комбінацій флавоноїдів і ендогенних антиоксидантів оцінювали за їх здатністю нейтралізувати гідроксильні радикали. Як джерело гідроксильних радикалів використовували реакцію Фентон, для індикації реакції використовували дибутират флуоресцеїну. Використано концентрації аскорбінової кислоти і глутатіону, що відповідають їх вмісту в еритроцитах, а концентрація сечової кислоти – утриманні в плазмі крові.

Безумовний ефект синергізму з біоантиоксидантами щодо антирадикальної активності проявили аглікони кверцетин (флавонол), геністеїн (ізофлавон) і нарингенін (флаванони). Таксифолін проявив вибірковий синергізм з сечовою кислотою і глутатіоном. У разі застосування глікозидів в ряді комбінацій спостерігався антагонізм: додавання глутатіону призводило до зниження АРА рутину, а додавання сечової і аскорбінової кислот зменшувало APA лютеоліну-7-глікозиду. Отримані результати добре узгоджуються з уявленнями, де приведені дані про більшу ефективність антиоксидантної дії агліконів на показники СРО в умовах наявності в клітинах біоантиоксидантів.

Всі вивчені аглікони флавоноїдів (таксифолін, 7-гідроксифлавон, нарингенін, геністеїн) підсилюють в присутності кверцетину свою антирадикальну активність, а глікозиди (рутин, лютеолін-7-глікозид) комбінуються з кверцетином за адитивним механізмом.

З огляду на те, що в складі багатьох природних лікарських препаратів представлений комплекс флавоноїдних агліконів, їх антиоксидантний ефект може бути обумовлений в тому числі й ефектом синергізму. Відзначимо також, що 7-гідроксифлавон дає істотне збільшення АРА в присутності галової кислоти, яка широко представлена в препаратах на основі рослинної сировини. АРА галової кислоти потенціюється або підсумовується з рядом інших флавоноїдів: за механізмом синергізму з кверцетином, апігеніном і геністеїном, за механізмом адитивності з рутином і нарингеніном.

Оскільки гліциризинова кислота є домінуючим компонентом такої широко використовуваної рослини як солодка, важливо було розглянути її вплив на АРА флавоноїдів, які також містяться в даній сировині. І в цьому випадку слід зазначити потенціючий вплив на АРА кверцетину, 7‑гідроксифлавону і геністеїну. Відносно рутину, нарингеніну і апігеніну можна говорити про ефект адитивності.

Дані результати підтверджують участь флавоноїдів з різним окислювально-відновним потенціалом і рівнем стабілізації семихінонових і радикальних форм в окисно-відновних циклах, що підвищують їх антиоксидантну активність, а також в регенеруючих і синергічних циклах з ендогенними антиоксидантами, що в свою чергу є важливим механізмом антиоксидантної дії флавоноїдвмісних препаратів.

**Висновки.**

1. На тлі експериментального інфаркту міокарду спостерігали зниження концентрації відновленого глутатіону, збільшення вмісту МДА, і зниження активності каталази в тканинах серця. Екстракт ромашки за цими показниками був найбільш ефективний, наступним за ефективністю виявився екстракт родіоли. Екстракти хмелю і кедра вираженого ефекту на ці показники не мали.
2. При введенні екстрактів родіоли і ромашки щурам через 24 години після операції, загальні розлади кровообігу в міокарді лівого шлуночка серця були менш виражені в порівнянні з контрольними тваринами. Розміри вогнища некрозу були значно менші, ніж у групі контрольних щурів.
3. На моделі експериментального інфаркту міокарда встановлено, що екстракт хмелю звичайного частково захищав кардіоміоцити від цитолізу, за показниками АЛТ, АСТ і ЛДГ, однак екстракт не мав вираженого ефекту на перебіг інфаркту міокарда і не володів антиоксидантними властивостями.
4. Екстракт насіння кедра сибірського проявляв кардіопротекторну дію в гострому періоді інфаркту міокарда, знижуючи кількість тварин з ЕКГ-ознаками інфаркту і частково захищаючи кардіоміоцити від цитолізу, найбільш ймовірно цей ефект пов'язаний з ендотелій-протекторним механізмом.
5. Встановлено, що з чотирьох досліджених речовин тільки екстракти родіоли і ромашки володіли системною антиоксидантною дією, нормалізовували показники антиоксидантного статусу (МДА, GSH, каталаза), як в крові, так і локально на рівні кардіоміоцитів.

**Рекомендації щодо використання одержаних результатів.**

Проведено експериментальне обґрунтування профілактичного і лікувального застосування біофлавоноїдів при експериментальному інфаркті міокарда. Подальше дослідження механізмів дії та властивостей біофлавоноїдів відкриє перспективу для розробки нових, більш ефективних кардіопротекторних лікарських препаратів на їх основі для корекції серцево-судинної патології.

Дипломна магістерська робота (проект) складається із вступу, чотирьох розділів, висновків до розділів і загальних висновків та списку використаних джерел. Загальний обсяг магістерської роботи (проекту) містить 96 сторінок комп’ютерного тексту (основна частина – 71 сторінки), 12 рисунків та 15 таблиць. Список використаних джерел становить 121 найменувань.

**Апробація результатів дослідження та публікації.**

Основні результати дипломної магістерської роботи:

- опубліковані у статті **збірнику «Фізико-органічна хімія, фармакологія та фармацевтична технологія біологічно активних речовин», Петруненко І.В., Кулик В.Б, назва статті: «Вплив флавоноїдвмісних екстрактів на розвиток експериментального». Київ: КНУТД**

**Ключові слова:** біофлавоноїди, кардіопротекція, інфаркт міокарда, судинні патології.