

ЭФФЕКТЫ КАНДЕСАРТАНА И ЕГО КОМБИНАЦИЙ С РЕСВЕРАТРОЛОМ НА ПРОЦЕССЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ *IN VITRO*

А.В. Беляева, В.Ю. Афонин, М.В. Анисович

ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,
ул. Академика В.Ф. Купревича, д. 5, к. 2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь
E-mail: Aleksandra447@yandex.ru

Введение. В Республике Беларусь в течение последних пятнадцати лет отмечается постоянный рост заболеваемости населения сердечно-сосудистыми патологиями. Так, с 2000 по 2011 год частота данных заболеваний возросла почти в два раза, причем лидирующими являются артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца и цереброваскулярные болезни. Также увеличивается частота смертности и инвалидности жителей республики от болезней системы кровообращения [1], поэтому создание новых эффективных и более безопасных методов профилактики, диагностики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний является актуальным.

Кандесартан цилексетил –антагонист рецепторов ангиотензина II. В медицинской практике применяется в качестве антигипертензивного средства длительного действия, которое способствует улучшению работы сердечной мышцы. Известно, что кандесартан повышает выносливость при физических нагрузках у людей, страдающих гипертензией. Однако средства на основе кандесартана обладают рядом побочных эффектов со стороны центральной нервной системы: отмечается головокружение, слабость, головная боль. Также показано, что высокие дозы кандесартана угнетают процессы формирования отдельных субпопуляций клеток в костном мозге [2].

Ресвератрол является эффективным природным антиоксидантом. В экспериментах с мышами и крысами были выявлены кардиопротекторные, противоопухолевые, противовоспалительные, нейропротекторные, понижающие уровень сахара в крови и другие положительные эффекты ресвератрола. Важным является то, что данный антиоксидант снижает размер повреждений сердечной мышцы у животных после инфаркта, а также уменьшает общий уровень холестерина. В настоящее время в Российской Федерации широко изучаются различные фармацевтические композиции с ресвератролом: комбинация ресвератрола и симвастатина (фармакологическая группа – статины) для создания препарата с гиполипидемическим действием, комбинация ресвератрола с эналаприлом (фармакологическая группа – ингибиторы АПФ) для разработки препарата, обладающего остеопротективным действием. Проводятся исследования эндотелио- и кардиопротективной активности комплекса ресвератрола с лозартаном (фармакологическая группа – антагонисты рецепторов ангиотензина II), а также с эналаприлом [3 – 5].

В данной работе были изучены композиции кандесартана и ресвератрола с целью исследования влияния данных субстанций на мобилизацию стволовых клеток и изменение молекулярно-биологических показателей клеток *in vitro*.

Материалы и методы исследования. Для изучения влияния выбранных нами субстанций на процессы мобилизации стволовых клеток CD117+ и на молекулярно-биологические параметры клеток *in vitro* были взяты клетки костного мозга мышей линии C57Bl/6, которые в дальнейшем высевались в ростовой среде (90% среды DMEM (Sigma), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (“HyClone”) с добавлением 0,1% антибиотиков (Antibiotic-antimycotic solution, Sigma) при плотности клеток $10^4/\text{см}^2$ в 6-луночные планшеты. Культуру инкубировали в CO₂-инкубаторе (37⁰C, 5% CO₂), в которую добавлялись кандесартан и ресвератрол в различных дозировках и комбинациях. Смена среды проводилась каждые 3 – 4 дня. Перед анализом на проточном цитофлуориметре клетки снимали 0,25% раствором трипсин/ЭДТА, промывали ФСБ (фосфатно-солевым буфером),

содержащем 0,1% ФСБ. Для оценки числа стволовых клеток CD117+ применялись коммерческие моноклональные антитела («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. Также исследовалось количество микроядер, проводилось изучение доли клеток в G₀/G₁, S, G₂/M фазах клеточного цикла.

Результаты и их обсуждение. В ходе выполнения работы было изучено влияние кандесартана цилексетила и ресвератрола на стимуляцию образования стволовых клеток CD117+ *in vitro*. Полученные в результате эксперимента данные представлены в таблице 1.

Было установлено, что кандесартан в дозах 3 мкг/мл и 1,5 мкг/мл не оказывает влияние на мобилизацию стволовых клеток *in vitro*. Количество клеток с фенотипом CD117+ в культуре клеток костного мозга мышей при использовании кандесартана в дозе 3 мкг/мл составило 4,0%, а при применении кандесартана в дозе 1,5 мкг/мл – 4,7%, в то время как в контроле это значение было 6,4%.

Комбинация кандесартана в дозе 1,5 мкг/мл и ресвератрола в дозе 10 мкг/мл способствовала снижению числа стволовых клеток до 2,4% (таблица 1).

Использование комплекса кандесартана в дозе 1,5 мкг/мл и ресвератрола в дозе 50 мкг/мл привело к увеличению количества клеток CD117+ до 8,7% по сравнению с контролем (6,4%) и другими группами (таблица 1).

Таким образом, для кандесартана цилексетила показано ингибирование пролиферативных процессов в культуре клеток костного мозга мышей линии C57Bl/6. Комбинация кандесартана в дозе 1,5 мкг/мл и ресвератрола в дозе 50 мкг/мл была эффективна в отношении мобилизации стволовых клеток CD117+ *in vitro*.

Таблица 1 – Результаты подсчёта клеток CD117+ *in vitro* на фоне введения кандесартана и ресвератрола

| № | Группа | Количество стволовых клеток, % |
|---|-----------------------------------|--------------------------------|
| 1 | контроль | 6,4 |
| 2 | канд. 3 мкг/мл | 4,0 |
| 3 | канд. 1,5 мкг/мл | 4,7 |
| 4 | канд. 1,5 мкг/мл и ресв.10 мкг/мл | 2,4 |
| 5 | канд. 1,5 мкг/мл и ресв.50 мкг/мл | 8,7 |

В ходе дальнейшего проведения исследований были изучены молекулярно-биологические эффекты кандесартана цилексетила и ресвератрола *in vitro*. Полученные результаты экспериментов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты подсчёта молекулярно-биологических параметров клеток *in vitro* при введении кандесартана и ресвератрола

| № | Группа | апоптоз, % | G ₀ /G ₁ , % | S, % | G ₂ /M, % | микроядра, % |
|---|--------------------------------------|--|------------------------------------|--|--|--|
| 1 | контроль | 7,56±0,26 | 72,34±2,42 | 20,29±1,93 | 7,36±1,06 | 4,43±0,48 |
| 2 | канд. 3 мкг/мл | 8,76±0,83 | 65,75±2,58 | 31,76±2,37 | 2,49±0,82 | 3,66±0,17 |
| 3 | канд. 1,5 мкг/мл и ресв.10 мкг/мл | 5,31±0,62 | 57,23±3,84 | 39,73±2,69 | 3,04±1,31 | 4,66±0,32 |
| 4 | канд. 1,5 мкг/мл и ресв.50 мкг/мл | 5,35±0,42 | 61,59±6,19 | 34,12±6,12 | 4,29±1,52 | 3,56±0,20 |
| | | P ₁₋₃ <0,05 P ₁₋₄ <0,05 P ₂₋₃ <0,05 P ₂₋₄ <0,05 | P ₁₋₃ <0,05 | P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 P ₂₋₃ <0,05 | P ₁₋₂ <0,05 P ₁₋₃ <0,05 | P ₂₋₃ <0,05 P ₃₋₄ <0,05 |

Было показано, что процент клеток с признаками апоптоза значительно снижался по сравнению с контролем и группой 1 при введении комбинаций кандесартана и ресвератрола. Так, при использовании комплекса кандесартана в дозе 1,5 мкг/мл с ресвератролом в дозе 10 мкг/мл количество клеток с признаками апоптоза составило $5,31 \pm 0,62\%$. При введении кандесартана в дозе 1,5 мкг/мл и ресвератрола в дозе 50 мкг/мл число апоптотических клеток было $5,35 \pm 0,42\%$, в то время как в контроле оно составило $7,56 \pm 0,26\%$, а в пробе с кандесартаном в дозе 3 мкг/мл равнялось $8,76 \pm 0,83\%$.

При изучении распределения клеток по стадиям клеточного цикла было показано, что кандесартан в дозе 3 мкг/мл приводит к увеличению количества клеток в S фазе клеточного цикла ($31,76 \pm 2,37$). Введение комбинации кандесартана в дозе 1,5 мкг/мл и ресвератрола в дозе 10 мкг/мл приводило к усилению пролиферативной способности клеток, что проявлялось накоплением последних в S фазе и снижением их числа в G₀/G₁ фазе клеточного цикла (таблица 2).

Заключение. В ходе выполнения работы было установлено, что комплекс кандесартана в дозе 1,5 мкг/мл и ресвератрола в дозе 50 мкг/мл увеличивает число стволовых клеток CD117+ *in vitro*. Комбинация кандесартана в дозе 1,5 мкг/мл и ресвератрола в дозах 10 мкг/мл и 50 мкг/мл эффективна в отношении снижения количества апоптотических клеток. Использование комплекса кандесартана и ресвератрола также оказывало влияние на пролиферативные процессы, протекающие в культуре клеток.

Литература

1. 19 апреля – День профилактики болезней сердца [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: www.28gp.by/index.php?page=edz12_hd. – Дата доступа: 26.01.2013.
2. 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. – 1998. – V. 354, № 2/3. – P. 179 – 187.
3. 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.
4. Файтельсон, А.В. Фармакологическая коррекция экспериментального остеопороза комбинацией ресвератрола с эналаприлом / А.В. Файтельсон // Научные ведомости. Серия медицина. Фармация. – 2012. – № 4 (123). – С. 239 – 244.
5. К вопросу фармакологической коррекции гипозэстрогениндуцированной эндотелиальной дисфункции / М.В. Корокин [и др.] // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2008. – №1. – С. 31 – 35.

EFFECTS OF CANDESARTAN AND ITS COMBINATIONS WITH RESVERATROL ON PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF CELLS FROM BONE MARROW OF MICE *IN VITRO*

A.V. Beliayeva, V.Yu. Afonin, M.V. Anisovich

The Institute of Bioorganic chemistry NAS of Belarus

We studied the influence of candesartan and resveratrol at different dosages and combinations on the mobilization of endothelial progenitor cells, on the molecular-biological parameters of cells from bone marrow of C57Bl/6 mice *in vitro*. It is shown that candesartan at 3 mkg/ml and 1,5 mkg/ml decreases the number of stem cells CD117+ *in vitro*. The combination of candesartan at 1,5 mkg/ml and resveratrol at 50 mkg/ml increases the number of endothelial progenitor cells *in vitro*. It is found that complex of candesartan and resveratrol is safety combination and effective in stimulation of formation of stem cells.