

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ТЕРАПІЇ ДІОСМІНОМ НА ЛІПІДНИЙ СПЕКТР КРОВІ І ОКИСНО-АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМУ ЩУРІВ, ЯКІ ЗНАХОДИЛИСЬ НА ДІЄТІ З ВИСОКИМ ВМІСТОМ ХОЛЕСТЕРИНУ

Кулик В.Б., Бессарабов В.І., Здерко Н.П., Вакуленко О.С.

Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, м. Київ, Україна, e-mail: kulyk@biph.kiev.ua

У статті описано дослідження впливу терапії діосміном на ліпідний профіль і окислювально-антиоксидантну систему у щурів, які отримували дієту з високим вмістом холестерину протягом трьох місяців. Діосмін – біофлавоноїд з венотонічною і ангіопротекторною активністю; зменшує розтяжність вен, підвищує їх тонус і зменшує явища венозного застою, підвищує резистентність капілярів і знижує їх проникність, покращує мікроциркуляцію. Експериментально доведено вплив флавоноїдів різних класів на окремі групи тканинних медіаторів запалення. Флавоноїди здатні пригнічувати індукцію хемокінів у тканинах людини. Так як основною причиною виникнення атеросклерозу є запалення судинного ендотелію то такі властивості діосміну можуть бути використані для профілактики та лікування атеросклерозу та інших захворювань пов'язаних з дисфункцією судинного ендотелію.

Ключові слова: ангіотропна дія, біофлавоноїд, діосмін, аналіз, ліпопротеїди.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF DIOSMIN THERAPY ON BLOOD LIPID SPECTRUM AND THE RED-OXIDE ANTIOXIDANT SYSTEM OF RATS ON A HIGH CHOLESTEROL DIET

Kylik V.B., Bessarabov V.I., Zderko N.P., Vakulenko O.S.

Kyiv National University of Technology and Design, Department of Industrial Pharmacy, Kyiv, Ukraine, e-mail: kulyk@biph.kiev.ua

The effect of diosmin therapy on lipid profile and redox in rats treated with a high-cholesterol diet for three months is described in the article. Diosmin – bioflavonoid with venotonic and angioprotective activity; reduces the distensibility of the veins, increases their tone and reduces the effects of venous stagnation, increases the resistance of capillaries and reduces their permeability, improves microcirculation. The influence of flavonoids of different classes on individual groups of tissue mediators of inflammation was experimentally proved. Flavonoids

are able to inhibit the induction of chemokines in human tissues. As the main cause of atherosclerosis is inflammation of the vascular endothelium, such diosmin properties can be used to prevent and treat atherosclerosis and other diseases associated with vascular dysfunction.

Keywords: angiotropic action, bioflavonoid, diosmin, analysis, lipoproteins.

Гіперліпідемія і гіперхолестеринемія є важливими факторами ризику розвитку атеросклерозу. В даний час профілактика атеросклерозу судин стала більш важливою, ніж лікування хвороби. З цієї причини запобігання факторів ризику, включаючи гіперхолестеринемію, є вельми важливим.

Флавоноїди – це група природних з'єднань, які містяться в рослинах, зазвичай споживаних людиною. Ці фенольні сполуки, особливо що містяться в фруктах і овочах, володіють багатьма біологічними та фармакологічними активностями, такими як інгібування ферментів, видалення вільних радикалів, протизапальна та антиоксидантна активність та інгібування розвитку пухлини [1, 2]. Про це повідомлялося в епідеміологічних дослідженнях. Довгострокове споживання флавоноїдів з їжею знижує частоту виникнення атеросклерозу і смертності від цього захворювання. З іншого боку, було висловлено припущення, що флавоноїди мають антиатеросклеротичну активність за допомогою інгібування окремих стадій утворення атероматозних бляшок [3].

Очищена мікронізована флавоноїдна фракція діосміну. Це потужний венотропний препарат, який довгий час використовувався при лікуванні хронічних венозних захворювань. Він підвищує венозний тонус, покращує відтік лімфи, зменшує кількість жирових клітин, пригнічує активацію лейкоцитів, інгібує секрецію простагландину, зменшує запальну реакцію, пригнічує синтез вільних кисневих радикалів і діє як поглинач цих вільних радикалів; таким чином, це покращує проникність капілярів і опір капілярів, які розширюються за рахунок вільних радикалів кисню [4, 5]. Крім того, в різних експериментальних дослідженнях було відзначено, що цей потужний агент запобігає пошкодженню віддалених органів при реперфузійній ішемії, зменшує окисне пошкодження

через гіперглікемію і пригнічує утворення внутрішньочеревної адгезії [5, 6].

Мета дослідження: вивчення впливу терапії діосміном на ліпідний профіль і окислювально-антиоксидантну систему у щурів, які отримували дієту з високим вмістом холестерину протягом трьох місяців.

Матеріали і методи дослідження.

Тридцять шість щурів породи Wisma вагою від 220 до 280 г були отримані в інституті фізіології ім. О.О. Богомольця. Тварин окремо містили в клітинах з нержавіючої сталі в кімнаті з контрольованою температурою (22-24°C) і освітленням (чергуючи 12-годинний період світла і темряви). Дослідження відповідало Керівництву по догляду та використанню лабораторних тварин, опублікованому Національним інститутом охорони здоров'я США (Публікація NIH № 85-23, переглянута в 1996 році). Шестимісячні щури були випадковим чином розділені на три групи (n=12 в кожній групі). Тварин в контрольній групі (група 1) протягом трьох місяців годували звичайним комбікормом. Тварини групи 2 (група з високим вмістом холестерину) і групи 3 (група з діосміном і високим вмістом холестерину). Випробування тривало протягом трьох місяців. Склади раціону наведені в таблиці 1. Крім того, щурам групи 3 вводили 100 мг/кг діосміну за допомогою орогастральної трубки. Тваринам давали їжу і дистильовану воду в достатній кількості протягом всього експериментального періоду.

В кінці експериментального періоду тварин анестезували кетаміном (10 мг/кг) і ксілазіном (3 мг/кг). Зразки крові були взяті з стегнової артерії для визначення ліпідних профілів плазми і окисного статусу. Зразки крові центрифугували при 4000 об/хв протягом 10 хвилин. Всі зразки зберігали при -70°C до дня аналізу.

Таблиця 1. Склад атерогенної та нормальної дієти.

Продукти	Нормальна дієта, %	Дієта з підвищеним вмістом холестерину, %
Пшениця	23	14
Соеве борошно	28	18
Кукурудза	18	12
Соняшникове насіння	11	10
Ячмінь	10	6
Соева олія	2	2
Кістковий порошок	4	4
Цукровий буряк	2	2
Вітаміни і мінерали	1	1
Бавовняна олія	0	30

Визначення вмісту ліпідів в плазмі крові щурів.

Рівні холестерину в плазмі визначали з використанням комерційного набору (Dade Behring Co., Німеччина). Тести на загальний холестерин, ліпопротеїди високої щільності (ЛПВЩ) і тригліцериди вимірювали з використанням автоаналізатора Behring RXL (Dade Behring Co., Німеччина). Ліпопротеїди дуже низької щільності (ЛПДНЩ) розраховували з використанням співвідношення тригліцерид/5 і холестерину ліпопротеїдів низької щільності.

Визначення окисного статусу в плазмі крові щурів.

Аналіз малонового диальдегіду. Рівні малонового диальдегіду в плазмі вимірювали спектрофотометрично. Реакційна суміш містила 0,1 мл зразка, 0,2 мл 8,1% додецилсульфату натрію, 1,5 мл 20% оцтової кислоти і 1,5 мл 0,8% водного розчину тіобарбітурової кислоти. рН суміші доводили до 3,5 і, нарешті, обсяг доводили до 4,0 мл дистильованою водою і додавали 5,0 мл суміші н-бутанолу та піридину (15:1, об. %). Суміш енергійно струшували. Після

центрифугування при 4000 об/хв протягом 10 хвилин вимірювали поглинання органічного шару при довжині хвилі 532 нм.

Аналіз активності супероксиддисмутази: супероксиддисмутазу визначали, як описано Фрідовичем [7]. Цей метод використовує ксантин і ксантиноксидазу для виділення супероксидних радикалів, які реагують з 2-(4-йодфеніл)-3-(4-нітрофеніл)-5-фенілтетразолій хлоридом з утворенням червоного барвника формазану. Супероксиддисмутазу вимірюють при 505 нм за допомогою спектрофотометричного ступеня інгібування цієї реакції. Середовище для аналізу містить 0,01 молярний фосфатний буфер і буфер CAPS [3-(Циклогексиламін)-1-пропансульфонової кислоти. Ксантин 0,05 мМ, 0,025 мМ INT[2-(4-йодфеніл)-3(4-нітрофеніл)-5-фенілтетразолій хлорид] і ксантиноксидазу (80 од/л) використовували в якості субстратів. Всі зразки були розраховані відповідно до стандартної кривої, а активність супероксиддисмутази (СОД) виражена в од/мг креатиніну.

Аналіз активності каталази. Активність каталази визначали шляхом вимірювання зменшення концентрації перекису водню при 230 нм. Середовище для аналізу складалася з 1 М Тріс-НСl; 5мМ Na₂EDTA буферний розчин (рН 8,0), 1 М фосфатний буферний розчин (рН 7,0) і 10 мМ Н₂О₂. Активність каталази виражали в од/мг креатиніну

Результати дослідження.

Тварини набрали приблизно 20-25% ваги в кінці експериментального періоду. Було встановлено, що рівні загального холестерину, холестерину низької щільності і тригліцеридів були вище в групі 2, ніж в групі 1. Ці рівні також були вище в групі 3, ніж в групі 1, але нижче, ніж в групі 2. Однак статистично не було істотна різниця між групами. Було виявлено, що рівні холестерину ліпопротеїдів високої щільності були нижче в групі 2, ніж в групі 1. У групі 3 рівні холестерину ЛПВЩ були вище, ніж в групах 1 та 2. Результати наведені в таблиці 2.

Таблиця 2. Рівні загального холестерину, холестерину ліпопротеїнів низької щільності, холестерину ліпопротеїнів високої щільності і тригліцеридів в сироватці крові.

Контрольовані параметри	Група 1 (моль/мл)	Група 2 (моль/мл)	Група 3 (моль/мл)	Зміни
Загальний холестерин	55,8	62,5	58,5	Н/з
ЛПНЩ	19,7	24,8	21,5	Н/з
Тригліцериди	62,4	80,2	67,6	Н/з
ЛПВЩ	24,5	23,7	29,3	З/з

Рівні малонового диальдегіду (проявляють окисне пошкодження) були вище в групах 2 і 3, ніж в групі 1. Хоча між групами 1 і 2 не було значних відмінностей у ставленні рівнів (GPX) глутатіонпероксидази, СОД і (виявляють антиоксидантний статус), було виявлено, що ці рівні значно вище в групі 3, ніж в групах 1 та 2 ($p < 0,05$). Не було значущої різниці між групами щодо рівнів каталази. Результати наведені в таблиці 3.

Таблиця 3. Рівні малонового диальдегіду, глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази і каталази в плазмі.

Контрольовані параметри	Група 1 (моль/мл)	Група 2 (моль/мл)	Група 3 (моль/мл)	Зміни
Малоновий диальдегід	0,9	1,3	1,2	Н/з
Глутатіонпероксидаза	18,1	19,9	26,0	З/з
Супероксиддисмутаза	94,5	93,6	111,7	З/з
Каталаза	90,4	88,1	90,5	Н/з

Висновки.

1. Флавоноїди є поглиначами супероксидних, гідроксильних і пероксидних радикалів, інгібіторами декількох ферментів, які відіграють істотну роль у синтезі супероксидних радикалів [8].

2. Флавоноїди також можуть знижувати прооксидантну активність, зв'язуючи іони металів [9, 10]. Таким чином, вони можуть допомогти підтримати антиоксидантний захист організму від вільних радикалів.

3. Дослідження проведене на лабораторних щурах показало, що рівні загального холестерину, ЛПНЩ і тригліцеридів в сироватці були вище у щурів, які отримували дієту з високим вмістом холестерину, ніж у щурів, які отримували нормальну дієту.

4. При лікуванні щурів, які отримували дієту з високим вмістом холестерину, діосмином, рівні загального холестерину, ЛПНЩ і тригліцеридів незначно знижувалися, але, що цікаво, рівні холестерину ЛПВЩ значно збільшилися. Збільшення рівня холестерину ЛПВЩ після лікування діосміном можна пояснити збільшенням рівня сироваткової пароксонази 1 людини (PON1). Якщо окислювальний стрес пригнічений, рівні PON1 збільшуються, і це забезпечує захист холестерину високої щільності від окислення. Пароксоназа 1 також знижує окислення холестерину ЛПНЩ шляхом гідролізу перекисів ліпідів [11, 21].

5. Антиоксиданти можуть пригнічувати розвиток артеріальних захворювань, зберігаючи функцію ендотелію [4, 9]. Вплив високих рівнів реактивних метаболітів кисню порушує гемостатичний баланс, що призводить до дисфункції ендотелію [13].

6. Аорти щурів з гіпертонічною хворобою, які отримували флавоноїди, показали гарну релаксацію у відповідь на ацетилхолін, флавоноїди викликали зниження артеріального тиску, і виявлено, що при лікуванні гіпертонічних тварин флавоноїдами зберігається ендотеліальна функція судин.

Список літератури.

1. Frydovich I. superoxide dismutase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol. Biol* 1974; 41: 35-97.
2. Сафарі М.Р., Шейх Н. Вплив флавоноїдів на сприйнятливість ліпопротеїнів низької щільності до окислювальної модифікації. *Простагландини Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69: 73-7.
3. Холлівелл Б., Стрижнік Дж., Дженнер А. Зміцнення здоров'я за допомогою флавоноїдів, токоферолів, токотрієнолів і інших фенолів: прямі або непрямі ефекти. *Антиоксидант чи ні*. 2005; 81: 268S-276S.
4. Девіс Н., Кац С., Уайлі-Розетт Дж. Вплив дієти на функцію ендотелію. *Cardiol Rev* 2007; 15: 62-6.
5. Yilmaz HG, Tacyildiz IH, Keles C, Gedik E, Kilinc N. The micronized purified fraction of flavonoids can prevent the formation of intraperitoneal adhesions in rats. *Fertil Steril* 2005; 84 Suppl 2: 10838.
6. Unlü A, Sucu N, Tamer L, Coskun B, Yücebilgiç G, Ercan B et al. Influence of daphne on oxidative stress caused by ischemia / reperfusion of hind limbs. *Pharmacol Res* 2003; 48: 11-5.
7. Енглер М.Б., Енглер М.М. Васкулозахисна дія багатих флавоноїдами какао і шоколаду. *Nutrition Research* 2004; 24: 695-706.
8. Пальців, М. А. Атеросклероз і артеріосклероз / М. А. Пальців, Н. М. Анічков // Патолог. анатомія / М. А. Пальців, Н. М. Анічков. - М. : Медицина. - 2001. - Т. 2 (Ч. 1). - С. 16-91.
9. Холлівелл Б., Стрижнік Дж., Дженнер А. Зміцнення здоров'я за допомогою флавоноїдів, токоферолів, токотрієнолів і інших фенолів: прямі або непрямі ефекти. *Антиоксидант чи ні*. 2005; 81: 268S-276S.

10. Jeon SM, Kim HK, Kim HJ, Do GM, Jeong TS, Park YB and others. Hypocholesterinemic and antioxidant effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol rats. *Transl Res* 2007; 149: 15-21.
11. Авірам М., Фурман Б. Винні флавоноїди захищають від окислення ЛПНЩ і атеросклерозу. *Ann NY Acad Sci* 2002; 957: 146-61.
12. Авірам М. Багаті флавоноїдами поживні речовини з потужною антиоксидантною активністю запобігають розвитку атеросклерозу: приклад солодки корінь. *Int Congr Ser* 2004: 320-745.
13. Lonchamp M, Guardiola B, Sicot N, Bertrand M, Perdrix L, Duhault J. Protective effect of purified flavonoid fraction from active oxygen radicals. In vivo and in vitro studies. *Arzneimittelforschung* 1989; 39: 882-5.