

ФАРМАКОЛОГИЯ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

ИЗУЧЕНИЕ ГЕПАТОЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРИРОДНЫХ ФЛАВОНОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Е. Г. Доркина¹

В опытах на белых беспородных крысах-самцах на модели острого СС14-гепатоза исследовано гепатозащитное действие лечебно-профилактического применения различных доз гесперидина из кожуры цитрусовых, диосмина из *Vicia tanuifolia* Roth. и аналога диосмина из *Vicia truncatula* по способности нормализовать биохимические показатели функционального состояния печени. В качестве препарата сравнения использовали карсил. Установлено, что более выраженным гепатозащитным действием обладает аналог диосмина в дозе 100 мг/кг, которое по ряду показателей превышает эффективность карсила в той же дозе. Вероятно, это связано с большей биодоступностью данного соединения, которую обеспечивает углеводный компонент, а также с наличием С₂-С₃ двойной связи в молекуле диосметина (агликон диосмина).

Ключевые слова: СС14-гепатоз, гепатозащитное действие, гесперидин, диосмин, аналог диосмина, карсил

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время остается высокой потребность в гепатопротекторных средствах, повышающих резистентность печени к действию химических агентов и нормализующих ее метаболизм в условиях напряжения детоксицирующей функции. Большое значение в проявлении гепатотоксического эффекта ксенобиотиков имеет усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах гепатоцитов [21, 23], где, в основном, и локализованы процессы метаболической биотрансформации чужеродных соединений. Для лечения токсических поражений печени, в первую очередь, применяют антиоксидантную терапию, направленную на ограничение ПОЛ и стабилизацию мембран [22]. Перспективными соединениями в качестве гепатопротекторов следует считать природные флавоноиды [2], обладающие широким спектром фармакологической активности, основой которой, по мнению большинства исследователей, считается антиоксидантное действие [4, 11 – 16, 19, 20]. Представляло интерес изучить гепатозащитное действие при токсическом поражении печени флавоноидов гесперидина и диосмина, которые структурно связаны между собой и являются составными компонентами ряда лекарственных препаратов (детралекс, диовенор 600, дафлон, вендетрекс и др.) [8], а также аналога диосмина, представляющего собой смесь 2 веществ: 7-арабинозил и 7-ксилозилглюкозидов диосметина [1]. Как известно, гликозидирование в большинстве случаев повышает раствори-

мость в воде, что очень важно для проявления физиологического действия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гесперидин — 7-О-рамноглюкозид гесперитина (5,7,3'-тригидрокси-4'-метоксифлавонон) — I — выделяли из кожуры цитрусовых, как описано [3], диосмин — 7-О-рамноглюкозид диосметина (5,7,3'-тригидрокси-4'-метоксифлавонон) — II — из *Vicia tanuifolia* (variabilis) Roth, как описано [5], аналог диосмина — смесь 7-О-ксилозил — (III) и 7-О-арабинозилглюкозидов — (IV) диосметина — из *Vicia truncatula* [1]. Идентификацию соединений проводили при помощи ТСХ, БХ, УФ- и ИК-спектроскопии. Все значения совпадали с полученными ранее: I: т.пл. 261 – 264 °С (из ДМСО); R_f 0,48; УФ-спектр, λ_{max}, нм: С₂Н₅ОН — 329, 284; ИК-спектр, см⁻¹: 1650, 1600, 1560 (–C=C аромат. ядра), 1350, 1260 (C–O), 1175, 3370 (–ОН), 1640 (C=O γ-пирона); II: т.пл. 290 – 293 °С (из смеси ДМСО-МеОН); R_f 0,39; УФ-спектр, λ_{max}, нм: С₂Н₅ОН — 345, 254; ИК-спектр, см⁻¹: 1605, 1510, 1450 (–C=C аромат. ядра), 2983 (–ОСН₃), 3250 (–ОН), 1650 (C=O); III: т.пл. 243 – 245 °С (из водного этанола); R_f 0,48; УФ-спектр, λ_{max}, нм: С₂Н₅ОН — 254, 343, 254, 344; ИК-спектр, см⁻¹: 3600 – 3200 (–ОН), 2920 (–ОСН₃), 1645 (C=O), 1600, 1495 (–C=C аромат. ядра), 1082, 953, 850, 780 (замещение в фенильном радикале); IV: т.пл. 270 – 273 °С (из водного этанола); R_f 0,43; УФ-спектр, λ_{max}, нм: С₂Н₅ОН — 253, 345; ИК-спектр, см⁻¹: 3600 – 3200 (–ОН), 2920 (–ОСН₃), 1645 (C=O), 1600, 1495 (–C=C аромат. ядра), 1080, 950, 855, 780 (замещение в фенильном радикале). Соединения выделены

¹ Кафедра биологической химии и микробиологии (зав. — доц. Е. Г. Доркина) Пятигорской государственной фармацевтической академии, Пятигорск, 357600, пр. Калинина, 11.

Таблица 1. Влияние лечебно-профилактического введения различных доз гесперидина на биохимические показатели функционального состояния печени при остром CCl_4 -гепатозе у крыс

Показатели	Интактные животные, $n = 6$	Контроль (CCl_4 -гепатоз), $n = 6$	Гесперидин, 25 мг/кг, $n = 5 - 6$	Гесперидин, 50 мг/кг, $n = 6$	Гесперидин, 100 мг/кг, $n = 6$
АЛТ сыворотки крови, мккат/л	$0,84 \pm 0,012$	$1,23 \pm 0,022^+$	$0,88 \pm 0,042^*$	$0,88 \pm 0,023^*$	$0,82 \pm 0,063^*$
ЩФ сыворотки крови, мккат/л	$1,21 \pm 0,061$	$2,58 \pm 0,120^+$	$1,37 \pm 0,120^*$	$1,17 \pm 0,085^*$	$1,15 \pm 0,11^*$
Общий билирубин сыворотки крови, мкмоль/л	$8,3 \pm 1,02$	$12,4 \pm 1,09^+$	$11,0 \pm 1,15$	$8,64 \pm 1,79^*$	$8,16 \pm 0,55^*$
Триглицериды печени, мкмоль/г	$19,2 \pm 1,84$	$78,3 \pm 5,80^+$	$42,3 \pm 7,95^*$	$44,5 \pm 5,25^*$	$32,9 \pm 5,44^*$
Гликоген печени, г/кг	$17,1 \pm 1,56$	$8,0 \pm 0,53^+$	$10,5 \pm 0,73^*$	$12,9 \pm 1,60^*$	$13,4 \pm 1,63^*$
ТБК-активные продукты печени, нмоль/мг белка	$0,057 \pm 0,0072$	$0,130 \pm 0,021^+$	$0,059 \pm 0,0055^*$	$0,079 \pm 0,027^*$	$0,056 \pm 0,0049^*$
Общий белок печени, мг/г	$454,4 \pm 53,55$	$320,1 \pm 31,86^+$	$509,3 \pm 20,21^*$	$492,7 \pm 17,67^*$	$536,7 \pm 48,3^*$

Примечание. Здесь и в табл. 2 различия достоверны при сравнении: $^+$ — $p < 0,05$ с интактными животными; * — $p < 0,05$ с контролем.

О. А. Андреевой, М. Р. Хочава, О. М. Шаренко на кафедре органической химии ПятГФА.

Гепатозащитное действие изучено на белых беспородных крысах-самцах массой 170 – 190 г на модели острого CCl_4 -гепатоза (введение внутрь 3 раза через день 50 % масляного раствора CCl_4 в дозе 0,15 мл/100 г массы тела). Вещества в различных дозах вводили внутрь за 7 дней до введения CCl_4 и затем на фоне воспроизведения CCl_4 — поражения печени. В качестве препарата сравнения использовали официальный гепатопротектор флавоноидной природы карсил в дозе 100 мг/кг [7]. Контролем служили животные, которым вводили такой же объем растворителя. Забой животных проводили путем декапитации через сутки после последнего введения. Эффективность гепатозащитного действия оценивали по нормализации биохимических показателей функционального состояния печени. Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) в сыворотке крови определяли по методу S. Reitman и S. Frankel, щелочной фосфатазы (ЩФ) — методу Бессея, Лоури, Брока, используя стандартные наборы “LaChema”, определение содержания в сыворотке крови общего билирубина проводили по Йендрашику [6]. Содержание гликогена в печени определяли по реакции с фенолом в кислой среде после щелочного гидролиза и выражали в г/кг [17]. Количество триглицеридов в гомогенате печени (мкмоль/г) измеряли по S. P. Gottfried, B. Rosenberg в модификации Сентебовой [9]. Для определения ТБК-активных продуктов в печени (реагирующих с тиобарбитуровой кислотой) за основу был взят метод Н. Ohkawa и соавт. [18], разработанный для гомогенатов ткани. Определение белка в печени проводили спектрофотометрически по разнице экстинкций при 260 и 280 нм [10]. Статистическую об-

работку результатов проводили с помощью t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из табл. 1, лечебно-профилактическое введение гесперидина в дозах 25, 50 и 100 мг/кг на фоне CCl_4 -гепатоза оказало по изученным показателям защитное действие на печень, эффективность которого увеличивалась при повышении дозы и была наиболее выраженной в дозе 100 мг/кг. При этом наблюдалось предотвращение гиперферментемии, вызванной введением CCl_4 , нормализация содержания общего билирубина в сыворотке крови, содержания гликогена и ТБК-активных продуктов в печени, более выраженное по сравнению с другими дозами (– 58 %) снижение содержания триглицеридов в печени, хотя оно еще достоверно отличалось от нормы, в большей степени повышалось содержание белка (+ 68 %) в печени. Эффективность гепатозащитного действия диосмина вводимого в дозе 100 мг/кг была сравнима с таковой гесперидина в той же дозе (табл. 2): наблюдалась нормализация в сыворотке крови активности АЛТ, ЩФ и содержания билирубина, содержания в печени гликогена, белка и ТБК-активных продуктов; триглицериды печени снизились на 59 %, оставаясь достоверно выше интактного уровня. Таким образом, близкие по структуре флавоноидные соединения в одной и той же дозе обладали практически одинаковым защитным действием при CCl_4 -гепатозе.

В то же время аналог диосмина при лечебно-профилактическом введении в дозе 100 мг/кг оказался более эффективным, чем диосмин и гесперидин в отношении нормализации сывороточных и печеночных показателей при CCl_4 -гепатозе. При этом не только предот-

Таблица 2. Влияние лечебно-профилактического введения диосмина и аналога диосмина на биохимические показатели функционального состояния печени при остром ССІ₄-гепатозе у крыс

Показатели	Интактные животные, n = 6	Контроль (ССІ ₄ -гепатоз), n = 6	Диосмин, 100 мг/кг, n = 6	Аналог диосмина, 100 мг/кг, n = 6	Карсил, 100 мг/кг, n = 6
АЛТ сыворотки крови, мккат/л	0,83 ± 0,042	1,73 ± 0,034 ⁺	1,02 ± 0,117*	0,79 ± 0,080*	0,89 ± 0,060*
ЩФ сыворотки крови, мккат/л	1,39 ± 0,082	1,88 ± 0,148 ⁺	0,96 ± 0,236*	0,80 ± 0,162*	1,15 ± 0,015*
Общий билирубин сыворотки крови, мкмоль/л	12,2 ± 1,44	19,0 ± 1,20 ⁺	10,0 ± 1,43	9,0 ± 1,55*	12,5 ± 2,22*
Триглицериды печени, мкмоль/г	20,4 ± 1,93	139,4 ± 16,27 ⁺	56,7 ± 6,93*	22,7 ± 6,39*	–
Гликоген печени, г/кг	16,9 ± 1,52	7,6 ± 0,55 ⁺	12,8 ± 3,39*	24,6 ± 3,44* ⁺	9,1 ± 0,45*
ТБК-активные продукты печени, нмоль/мг белка	0,29 ± 0,014	0,49 ± 0,042 ⁺	0,30 ± 0,036*	0,26 ± 0,044*	0,30 ± 0,057*
Общий белок печени, мг/г	112,0 ± 2,73	87,4 ± 6,25 ⁺	114,8 ± 8,21*	183,5 ± 24,47* ⁺	110,0 ± 1,82*

вращалась гиперферментемия и гипербилирубинемия, но также нормализовалось содержание триглицеридов в печени, а содержание в печени белка и особенно гликогена было достоверно выше не только по сравнению с контролем (+ 110 и + 222 % соответственно), но и с интактными животными (+ 64 и + 46 % соответственно). Нужно отметить, что по ряду показателей (билирубин сыворотки, гликоген и белок печени) изученные флавоноидные соединения, особенно аналог диосмина, превосходили гепатозащитное действие карсила, изученного в дозе 100 мг/кг. Полученные данные показывают, что большое значение в проявлении защитного действия изученных флавоноидов и карсила имеет антиоксидантная активность, т.к. при их применении одновременно с нормализацией показателей функционального состояния печени наблюдалось снижение содержания в данном органе перекисных ТБК-активных продуктов, количество которых значительно увеличивалось при ССІ₄-гепатозе (табл. 1, табл. 2).

Поскольку аналог диосмина отличается от самого диосмина лишь углеводным фрагментом, результаты наших исследований свидетельствуют о вкладе данного фрагмента в проявление гепатозащитной активности. Напротив, в ряде работ указывается, что функционально активной частью молекул флавоноидов являются ОН-группы ароматических ядер, которые являются “ловушками” радикалов и обуславливают антирадикальное, а, следовательно, и антиоксидантное действие флавоноидов [11 – 16, 19, 20]. В ранее проведенных нами исследованиях [4] установлено, что дигликозиды гесперидин и диосмин не влияли на интенсивность Fe²⁺-аскорбатзависимого ПОЛ постядерной фракции печени *in vitro*, тогда как их агликоны в тех же концентрациях проявили антиоксидантное действие. При этом отмечалась большая активность диосметина по сравнению с гесперитином, отличающегося наличием 2,3 двойной связи. Наибольшее антиокси-

дантное действие флавоноидов с двойной связью между С₂ и С₃ и 3',4'-диоксигруппами продемонстрировано и другими авторами [12 – 16, 19, 20]. Учитывая вышеизложенное можно предположить, что в тканях организма флавоноидные соединения в результате метаболических превращений участвуют в поддержании оптимального уровня свободно-радикального ПОЛ биомембран в виде агликонов: диосмин и его аналог — в виде диосметина, а гесперидин — в виде гесперитина. Углеводный компонент, вероятно, имеет значение в повышении биодоступности флавоноидных соединений. Возможно, более выраженное гепатозащитное действие аналога диосмина связано с наличием в диосметине 2,3-двойной связи, а также с усилением его биодоступности, т.к. замена рамнозы на ксилозу или арабинозу в углеводном остатке значительно повышает водорастворимость аналога диосмина.

ВЫВОДЫ

1. Аналог диосмина обладает более выраженным гепатозащитным действием, чем диосмин и гесперидин при лечебно-профилактическом введении в дозе 100 мг/кг в условиях острого ССІ₄-гепатоза, которое по ряду показателей превышает эффективность карсила в той же дозе.

2. Более высокая активность аналога диосмина может быть связана с большей биодоступностью, которую обеспечивает углеводный компонент, а также с наличием С₂-С₃ двойной связи в молекуле диосметина (агликон диосмина).

ЛИТЕРАТУРА

1. О. А. Андреева, М. Н. Ивашев, И. И. Озимица, Г. В. Масликова, *Хим.-фарм. журн.*, **32**(11), 28 – 30 (1998).
2. А. В. Гордиенко, *Фармация*, № 3, 75 – 78 (1990).
3. Е. Г. Доркина, Э. Т. Оганесян, М. Р. Хочава, и др., Деп. в ВИНТИ 11.07.2002, № 1308-B2002.

4. Е. Г. Доркина, Э. Т. Оганесян, М. Р. Хочава, Ю. А. Мальцев, *Материалы Междунар. съезда*, СПб. (2000), 155 – 157.
5. М. Н. Ивашев, О. А. Андреева, В. А. Бандюкова, Т. Д. Драгалева, *Хим.-фарм. журн.*, № 9, 39 – 41 (1995).
6. В. Г. Колб, В. С. Камышников, *Справочник по клинической химии*, Беларусь, Минск (1982).
7. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, 12-е изд., перераб., испр. и доп., Ч.1, Новая волна, Москва (1996).
8. С. В. Моисеев, *Клин. фармакол. и тер.*, 7(4), 75 – 79 (1998).
9. Н. А. Сентебова, Н. В. Салицкая, *Унификация лабораторных методов исследования*, Москва (1978), сс. 67 – 75.
10. Е. А. Строев, В. Г. Макарова, *Практикум по биологической химии*, Высш. шк., Москва (1986).
11. A. Arora, M. G. Nair, and G. M. Strasburg, *Free Radic. Biol. Med.*, № 9, 1355 – 1366 (1998).
12. G. Cao, E. Sofic, and R. L. Prior, *Free Radic. Biol. Med.*, 22(5), 749 – 760 (1997).
13. Z. Y. Chen, P. T. Chan, K. Y. Ho, et al., *Chem. And Phys. Lipids*, 79, 157 – 163 (1996).
14. M. Fotti, M. Piattelli, M. T. Baratta, and G. Ruberto, *J. Agr. And Food Chem.*, 44(2), 497 – 501 (1996).
15. Y. Hanasaki, S. Ogawa, and S. Fukui, *Free Radic. Biol. Med.*, 16, 605 – 608 (1992).
16. E. J. Lien, H.-H. Bui, and R. Wang, *Free Radic. Biol. Med.*, 26(3, 4), 285 – 294 (1999).
17. R. Montgomery, *Arch. Biochem. Biophys.*, № 2, 378 (1957).
18. H. Ohkawa, N. Ochihi, and K. Vagi, *Anal. Biochem.*, № 2, 351 – 538 (1979).
19. K. Ratty and N. P. Das, *Biochem. Med. And Metab. Biol.*, 39(1), 69 – 79 (1988).
20. G. M. Shah and R. K. Bhattacharya, *Chem-Biol. Interest.*, 59(1), 1 – 15 (1986).
21. F. R. Ungemach, *Chem. And Phys. Lipids*, 45(2 – 4), 171 – 205 (1987).
22. A. Valensuella, C. Lagos, K. Schmidt, and L. A. Videla, *Biochem. Pharmacol.*, 34(12), 2209 – 2212 (1985).
23. M. Yones and C.-P. Siegers, *Biochem. Pharmacol.*, 33(3), 2001 – 2003 (1984).

Поступила 04.09.03

INVESTIGATION OF THE HEPATOPROTECTOR ACTION OF NATURAL FLAVONOIDS

E. G. Dorkina

Biochemistry and Microbiology Department, Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy, pr. Kalinina 11, Pyatigorsk, 357600 Russia

The prophylactic hepatoprotective properties of a series of natural flavonoids (hesperidin from citrus peel, diosmine from *Vicia tanuifolia* Roth., and diosmine analog from *Vicia truncatula*) were studied in a group of white male rats with a model of acute CCl₄ hepatitis. The effect was evaluated by the ability of tested substances to normalize the biochemical characteristics of the functional state of the liver, in comparison to the reference drug carsil. The most pronounced hepatoprotective action was observed for diosmine analog administered in a dose of 100 mg/kg, which was superior in some respects to the reference hepatoprotector (in equivalent doses). This is probably related to the higher bioaccessibility of diosmine analog ensured by a carbohydrate moiety of this compound, in combination with the C₂-C₃ double bond present in diosmetin (diosmin aglycon).