

## ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ АНТИОКСИДАНТНЫМ ДЕЙСТВИЕМ ФЛАВОНОИДОВ И ИХ ВЛИЯНИЕМ НА ВАЗОДИЛАТИРУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ЭНДОТЕЛИЯ В УСЛОВИЯХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

И. Н. Тюренков, А. В. Воронков, А. А. Слиецанс, Е. В. Петрова, Е. Г. Доркина<sup>1</sup>

Выявлена зависимость между вазодилатирующей активностью флавоноидов при эндотелиальной дисфункции, индуцированной экспериментальным сахарным диабетом, и их антиоксидантным действием. Наибольшим влиянием на вазодилатирующую функцию эндотелия в условиях его дисфункции и более выраженной антиоксидантной активностью обладают флавицин и кверцетин.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, эндотелиальная дисфункция, окислительный стресс, флавоноиды

### ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет — широко распространенное прогрессирующее заболевание, сосудистые осложнения которого приводят к ранней инвалидизации и смертности. Частой патологией при сахарном диабете и одной из причин преждевременной смерти является поражение печени. Стоит отметить, что одним из основных и пусковых патофизиологических механизмов при сахарном диабете, приводящим к развитию сосудистых и макроорганных нарушений, является окислительный стресс [2]. Так, например, окислительный стресс инициирует нарушения, связанные с кровоснабжением печени (повреждение эндотелия сосудов и синусоидов печени с изменением выработки окиси азота, ухудшение реологических свойств крови, состояния микроциркуляторного русла и пр.), что усугубляет течение основного патологического процесса [1].

Учитывая важную роль оксидативного стресса при развитии эндотелиальной дисфункции, становится целесообразным изучение эндотелиопротекторного действия средств, обладающих высокой антиоксидантной активностью. К группе таких соединений относятся вещества флавоноидного ряда, которые являются весьма перспективными для их изучения в качестве эндотелиопротекторов [5, 9]. Несмотря на большое количество работ, посвященных этой проблеме, ранее не проводилось сравнительного изучения зависимости между антиоксидантной активностью флавоноидов и их влиянием на вазодилатирующую функцию эндотелия, которые являются одними из основных компонентов их эндотелиопротекторного действия. В данном исследовании сделана попытка проанализировать, в какой мере антиоксидантное действие четырех флавоноидов (кверцетин, флавицин, гесперидин, диосмин) сочетается с эндотелиопротекторным.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено двумя отдельными блоками на 168 крысах-самцах линии Вистар, массой 200–250 г.

Эндотелиальную дисфункцию в обоих блоках экспериментов вызывали воспроизведением патологических состояний, приводящих к окислительному стрессу.

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии и биофармации ФУВ (зав. — проф. И. Н. Тюренков), Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, 400131, ул. Пугачевская, 3.

В первом блоке моделировали эндотелиальную дисфункцию, вызванную развитием экспериментального сахарного диабета (ЭСД) путем однократного введения стрептозотоцина (45 мг/кг, в вену). Через 3 дня после введения стрептозотоцина отбирали животных с уровнем глюкозы в крови 12–15 ммоль/л, которые были разделены на группы по 12 животных в каждой: интактная группа, группа животных с ЭСД, получавших физиологический раствор, четыре группы животных с ЭСД, которым *per os* в течение 4 недель вводили флавицин, кверцетин, гесперидин, диосмин (100 мг/кг).

Через месяц после моделирования сахарного диабета и введения изучаемых веществ осуществлялось тестирование эндотелий-зависимой и эндотелий-независимой вазодилатации путем регистрации кровотока в проекции средней мозговой артерии в сосудах мозга. Самая мощная и наиболее уязвимая NO-синтазная система регистрируется в сосудах головного мозга, поэтому нами в качестве объекта исследования для оценки вазодилатирующей функции эндотелия, были выбраны мозговые сосуды.

Вазодилатирующая функция эндотелия в значительной мере связана с работой NO-синтазной системы, поэтому для оценки ее функционирования использовали тесты с введением ацетилхолина (АЦХ) (0,001 мг/кг), нитро-L-аргинина (10 мг/кг) — блокатора e-NOS. Чем выше функция этой системы, тем больше прирост кровотока после введения АЦХ и больше снижение кровотока после введения нитро-L-аргинина [8]. Для оценки эндотелиальной функции (дисфункции) в дополнение к первым двум использовали тест с введением L-аргинина (300 мг/кг) с целью идентификации L-аргининового парадокса — как показателя эндотелиальной дисфункции и нарушения синтеза окиси азота [3, 8]. Все анализаторы произведены фирмой “Acros organics”, США. Для оценки эндотелий-независимой вазодилатации использовали нитроглицерин (НТГ) (0,007 мг/кг), МТХ, Москва.

Регистрацию кровотока во всех экспериментах осуществляли с помощью ультразвукового доплерографа, датчика УЗОП-010-01 с рабочей частотой 25 МГц и компьютерной программы ММ-Д-К-Minimax Doppler v.1.9. (Санкт-Петербург, Россия).

В другой серии экспериментов эндотелиальную дисфункцию формировали на одной из наиболее патологически сильных моделей оксидативного стресса, вызван-

ного путём введения *per os* с помощью зонда 3 раза через день 50% раствора  $CCl_4$  в вазелиновом масле (0,15 мл/100 г массы тела) [7]. Животных с поражениями печени, в свою очередь, делили на группы: интактные животные, контрольная группа, получавшая эквивалентное количество растворителя  $CCl_4$  в вазелиновом масле, четыре группы животных, которым вводили внутрь (при помощи зонда в желудок) в виде водной суспензии ежедневно в дозе 100 мг/кг за 7 дней до введения  $CCl_4$ , а затем еще 5 дней на фоне воспроизведения модели поражения печени кверцетин, флавицин, гесперидин, диосмин. Животные получали вещества утром до кормления в одно и то же время.

Забой животных опытных и контрольной групп с гепатозом проводили путём декапитации под лёгким эфирным наркозом через 24 ч после последнего введения  $CCl_4$  одновременно с группой интактных крыс. За 12 – 14 ч до забоя животные были лишены пищи.

Далее проводили оценку антиоксидантной активности флавоноидов (как одного из компонентов эндотелиопротекторного действия изучаемых веществ).

Определение вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — ТБК-активных продуктов — в сыворотке крови проводили по реакции с тиобарбитуровой кислотой с использованием диагностического набора “Агат-Мед” на СФ-46 при длине волны 570 нм пропорционально концентрации малонового диальдегида (МДА).

Оценивали мощность эндогенной антиоксидантной системы (АОС).

Активность глутатион-S-трансферазы (Г-S-T) определяли в постъядерной фракции печени (ПФП) спектрофотометрически при комнатной температуре (25 °С) по образованию продукта конъюгации 1-хлор-2,4-динитробензола (ХДНБ) с восстановленным глутатионом в среде, содержащей 0,1 М К-фосфатный буфер, 0,1% тритона X-100, 1 мМ ХДНБ, 5мМ GSH, 0,2 – 0,5 мг белка на 1 мл среды инкубации. Активность измеряли на КФК-3 при 340 нм и выражали в нмоль образовавшегося продукта на 1 мг белка за 1 мин.

Восстановленный глутатион определяли по реакции с аллоксаном с образованием продукта “аллоксан-305”,

имеющего максимум поглощения при 305 нм в безбелковом фильтрате. Количество образующегося комплекса прямо пропорционально содержанию GSH в пробе. Расчет количества глутатиона в пробе проводили с помощью калибровочной кривой, построенной по стандартным растворам восстановленного глутатиона. Результаты содержания GSH выражали в г/кг [6].

Общую АОА сыворотки крови определяли в модельной системе окисления суспензии желточных липопротеидов, индуцированного  $Fe^{2+}$ . Метод основан на способности антиокислителей, входящих в состав сыворотки, тормозить накопление продуктов ПОЛ, уровень которых определяется по их способности образовывать с тиобарбитуровой кислотой окрашенные продукты [4].

Полученные данные обрабатывали с помощью программы статистического анализа BioStat 2008 с использованием параметрических (t-критерий Стьюдента) и непараметрических (критерий Манна-Уитни) критериев. Данные представлены в виде арифметической средней  $\pm$  ошибка среднего. С целью изучения статистической взаимосвязи проводили расчет коэффициента корреляции Спирмена ( $r$ ). Данные считали статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты первого блока исследований, отражающие изменения кровотока у животных контрольной группы без ЭСД, у животных с ЭСД, получавших физиологический раствор, и животных, получавших в течение месяца после введения стрептозотоцина флавицин, кверцетин, гесперидин и диосмин, представлены в таблице.

Эти данные свидетельствуют о том, что ЭСД, индуцированный стрептозотоцином, вызывает выраженное снижение вазодилатирующей функции эндотелия. Снижение обусловлено нарушением функционирования e-NO-синтазной системы, о чем свидетельствует меньшая вазодилатация (меньшее увеличение скорости кровотока) при введении ацетилхолина, меньшая вазоконстрикция при введении блокатора e-NO-синтазы N-L-аргинина, но большее повышение вазодилатации при введении L-аргинина (выраженный L-аргининовый парадокс).

### Изменение вазодилатации у животных с сахарным диабетом (СД) на фоне введения флавоноидов

Группа животных	Изменения кровотока при введении анализаторов			
	Прирост кровотока от исходного уровня, %			Падение кровотока от исходного уровня, %
	ацетилхолин, 0,001 мг/кг	L-аргинин, 300 мг/кг	нитроглицерин, 0,007 мг/кг	N-L-аргинин, 10 мг/кг
Контроль – интактные животные	36,6 $\pm$ 3,8	6,7 $\pm$ 1,64	50,6 $\pm$ 2,44	33,18 $\pm$ 2,25
Контроль – СД	14,16 $\pm$ 2,21***	53,75 $\pm$ 3,25***	49,66 $\pm$ 1,86	13,48 $\pm$ 1,95***
Флавицин + СД	26,93 $\pm$ 2,82*##	17,55 $\pm$ 2,48*#	49,43 $\pm$ 3,21	20,93 $\pm$ 2,15*#
Кверцетин + СД	24,01 $\pm$ 2,65*##	20,61 $\pm$ 2,42*#	48,57 $\pm$ 2,89	21,6 $\pm$ 2,00*#
Гесперидин + СД	20,66 $\pm$ 3,12*##	32 $\pm$ 2,78*#	50 $\pm$ 2,66	16,27 $\pm$ 1,67**
Диосмин + СД	18,31 $\pm$ 2,89**	30,11 $\pm$ 3,04*#	50,56 $\pm$ 1,95	18,71 $\pm$ 1,89*#

**Примечание.** Различия значимы по отношению к группе: \* — интактных животных ( $p \leq 0,05$ ), \*\* — интактных животных ( $p \leq 0,01$ ), \*\*\* — интактных животных ( $p \leq 0,001$ ), # — животных с сахарным диабетом без лечения ( $p \leq 0,05$ ), ## — животных с сахарным диабетом без лечения ( $p \leq 0,01$ ). Значимость оценивали с помощью критерия Манна-Уитни.

Эндотелий-независимая вазодилатация, вызванная введением нитроглицерина, как донатора NO, во всех группах животных была сопоставимой.

Введение животным с ЭСД флавицина и кверцетина приводит к улучшению функционирования NO-синтазной системы, что проявляется в более выраженной реакции сосудов в ответ на введение АЦХ и N-L-аргинина по сравнению с контрольной группой животных с ЭСД. Диосмин и гесперидин уступают по вазодилатирующей активности соединениям — лидерам, флавицину и кверцетину.

Данные второго блока исследований по влиянию курсового применения (12 дней) флавицина, гесперидина, диосмина в дозе 100 мг/кг на интенсивность процессов ПОЛ свидетельствуют о том, что содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови у крыс всех опытных групп достоверно снижено, при этом наиболее выраженное подавление ПОЛ отмечалось под влиянием флавицина (–77%), в меньшей степени при введении гесперидина (–66%), диосмина (–45%). У группы животных, получавших флавицин, содержание ТБК-активных продуктов в крови было достоверно ниже, чем у животных, получавших диосмин, на 59%.

Курсовое применение флавоноидов привело к активации АОЗ, т.е. к активации систем, участвующей во II фазе детоксикации ксенобиотиков и накоплению в тканях восстановленной формы глутатиона. Наибольшее повышение активности Г-S-T наблюдалось у флавицина (на 23%), затем следовали гесперидин и диосмин. Повышение содержания GSH, основной функцией которого является восстановление SH-групп ферментов и других белков при их окислении или связывании в печени, наблюдалось в большей степени также у флавицина, затем по активности следовали диосмин и гесперидин.

Изучение антиоксидантного действия флавицина и кверцетина на модели Fe<sup>2+</sup>-индуцированного ПОЛ в суспензии липосом из фосфатидилхолина яичного желтка по торможению образования МДА показало, что флавицин и кверцетин ингибируют Fe<sup>2+</sup>-индуцированное ПОЛ в системе липосом, т.е. обладают прямым антиоксидантным действием. В такой системе преимущественно действуют ингибиторы липидных радикалов и вещества, способные влиять на концентрацию железа. По эффективности антиоксидантного действия флавоноиды располагаются следующим образом: кверцетин > флавицин > диосмин > гесперидин.

Анализируя полученные данные, мы можем отметить, что флавоноидные соединения оказывают выраженное антиоксидантное действие на модели острого поражения печени и значительно улучшают вазодилатирующую

функцию эндотелия, вызванную стрептозотоцин-индуцированным сахарным диабетом, выступая в качестве эндотелиопротекторов, на фоне оксидативного стресса различного генеза. Причем в наибольшей степени улучшают вазодилатирующую функцию при эндотелиальной дисфункции флавицин и кверцетин, они же оказывают более выраженное антиоксидантное действие.

В ходе корреляционного анализа выявлена значительная положительная функциональная связь ( $r = 0,54$ ) между состоянием антиоксидантной системы и улучшением вазодилатирующей функции эндотелии в группе животных с СД, получавших флавицин. В группах животных с СД, получавших в качестве фармакокоррекции кверцетин, гесперидин и диосмин, между данными показателями установлена умеренная корреляционная связь ( $r = 0,46$ ,  $r = 0,45$  и  $r = 0,39$  соответственно). Результаты анализа позволяют считать, что улучшение общей антиоксидантной защиты организма под влиянием исследуемых флавоноидов предупреждает дисфункцию эндотелия при экспериментальном сахарном диабете.

## ВЫВОДЫ

1. Флавоноиды улучшают вазодилатирующую функцию при эндотелиальной дисфункции, вызванной экспериментальным сахарным диабетом.
2. Флавоноиды, оказывающие наиболее выраженное эндотелиопротекторное действие (флавицин, кверцетин) обладают и наиболее сильными антиоксидантными свойствами.
3. Выявлена значительная положительная корреляционная связь между антиоксидантным действием флавоноидов и степенью улучшения вазодилатирующей функции эндотелия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. О. Я. Бабак, *Укр. терапевт. ж.*, № 6, 14 – 15 (2008).
2. М. И. Балаболкин, *Сахарный диабет*, № 5, 8 – 16 (2002).
3. А. В. Воронков, А. И. Робертус, И. Н. Тюренков, *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*, 7(3), 54 – 58 (2008).
4. Г. И. Клебанов, *Лаб. дело*, № 5, 59 – 62 (1988).
5. М. Н. Макарова, *Фармация*, № 2, 30 – 32 (2004).
6. М. И. Прохорова, *Методы биохимических исследований*, Изд-во Ленинград. унив. (1982).
7. Н. П. Скакун, *Фармакол. и токсикол.*, 50(3), 97 – 99 (1987).
8. И. Н. Тюренков, А. В. Воронков, *Экспер. и клин. фармакол.*, 71(1), 49 – 51 (2008).
9. M. Rajendran, *J. Agric. Food. Chem.*, № 24, 7389 – 7394 (2004).

Поступила 12.04.10

## RELATIONSHIP BETWEEN THE ANTIOXIDANT EFFECT OF FLAVONOIDS AND THEIR EFFECT ON THE VASODILATING FUNCTION OF ENDOTHELIUM UNDER ENDOTHELIAL DYSFUNCTION CONDITIONS

I. N. Tyurenkov, A. V. Voronkov, A. A. Slietsans, E. V. Petrova, and E. G. Dorkina

Pharmacology and Biopharmacy Department, Volgograd State Medical University, Volgograd, Pugachevskaya ul. 3, Volgograd, 400131, Russia

A relationship between the vasodilating activity of flavonoids under conditions of endothelial dysfunction in experimental diabetes and their antioxidant effect is established. Flavacin and quercetin show the maximum influence on the vasodilating function of endothelium and exhibit more pronounced antioxidant activity under conditions of endothelial dysfunction.

**Key words:** Diabetes mellitus, endothelial dysfunction, oxidative stress, flavonoids