УДК 615.012/.014

И.А. Батанина, Е.Н. Воробьева, Д.С. Бубликов, Г.Г. Соколова

Изменение параметров оксидантно-антиоксидантного статуса под действием растительных флавоноидов

I.A. Batanina, E.N. Vorobyova, D.S. Bublikov, G.G. Sokolova

Oxidant-Antioxidant Status Parameters Variation Influenced by Vegetative Flavonoids

Среди многообразия растительной флоры Алтайского края существуют лекарственные растения, фармакотерапевтические свойства которых обусловлены наличием биологически активных веществ – полифенольных соединений (флавоноидов), которые предположительно могут оказывать влияние на различные звенья патогенеза атеросклероза. В связи с этим представляется перспективной разработка комплексных лекарственных препаратов на основе растений.

Ключевые слова: флавоноиды, оксидантно-антиоксидантный статус, каталаза, гиперхолестеринемия.

Among variety of vegetative flora at the Altai Territory there are medicinal plants, pharmacy and therapeutic properties of which are caused by the presence of biologically active materials – polyphenolic compounds (flavonoids), which presumably may influence on different parts of atherosclerosis. In this connection the working out complex herbal drugs on the basis of herbal plants is perspective.

Key words: flavonoids, oxidant and antioxidant status, catalase, hypercholesterinaemia.

По прогнозам экспертов ВОЗ, к 2020 г. смертность населения в мире может достичь 25 млн чел. в год, причем основной ее причиной будут заболевания органов кровообращения. На сегодняшний день основными причинами смертности от сердечно-сосудистой патологии являются ишемическая болезнь сердца (в 51% случаев) и нарушения мозгового кровообращения (27% случаев), развитие которых преимущественно обусловлено атеросклеротическим поражением коронарных и мозговых артерий [1, с. 4–8].

Атеросклероз представляет собой разновидность хронического воспалительного или иммунного процесса в сосудистой стенке, ключевую роль в котором играют макрофаги, трансформированные из моноцитов крови и мигрирующие в субэндотелиальное пространство [2, с. 1–10]. Важную роль в трансформации циркулирующих моноцитов крови, а соответственно в атерогенезе играет окислительный стресс, который может быть вызван общими факторами риска, такими, как курение, психосоциальный стресс и артериальная гипертензия. Важным биохимическим следствием воздействия различных факторов является локальная или системная гиперпродукция оксирадикалов типа супероксида и гидроксида, которые в умеренных количествах выступают в роли межклеточных медиаторов, обусловливающих адаптивные перестройки в органах-мишенях. Влияние стресс-факторов может вызвать неадекватное накопление этих оксирадикальных молекул, что приводит к повреждению мембранных и ядерных структур клеток, возникновению эндотелиальной дисфункции, что характеризуется нарушением синтеза оксида азота (NO) [3, с. 80–86]. Активные формы кислорода из различных источников, в том числе образовавшиеся в результате нарушений дыхательной цепи митохондрий, при патологических состояниях играют фундаментальную роль в повреждениях эндотелия при развитии атеросклероза и его осложнений [4, с. 259–275]. Согласно современной схеме патогенеза атеросклероза (см. рисунок) уже минимально окисленные ЛПНП могут повышать экспрессию в эндотелиоцитах хемоаттрактантов типа МСР-1, колониестимулирующих факторов типа MCSF (моноцит, макрофагальный колониестимулирующий фактор), а также адгезивных молекул типа VCAM-1 и ICAM-1. Макрофаги связывают и интернализируют окисленные ЛПНП, что влечет за собой трансформацию в пенистые клетки [5, с. 17; 6, с. 11].

Таким образом, первым шагом в патогенезе атеросклероза становится эндотелиальная дисфункция, возникающая на ранних этапах атерогенеза. Защита от реакций свободнорадикального окисления обеспечивается антиоксидантными энзимами организма – супероксиддисмутазой, каталазой, глутатионпероксидой, а также метаболическими жирорастворимыми и водорастворимыми антиоксидантами [7, с. 370–374]. В процессах подавления оксидантного стресса принимает участие не только естественная антиоксидантная система позвоночных, но и различные группы биологически активных веществ – флавоноидов. Биологическая роль флавоноидов в растительной клетке определяется способностью образовывать прочные хелатные комплексы с различными ионами метал-

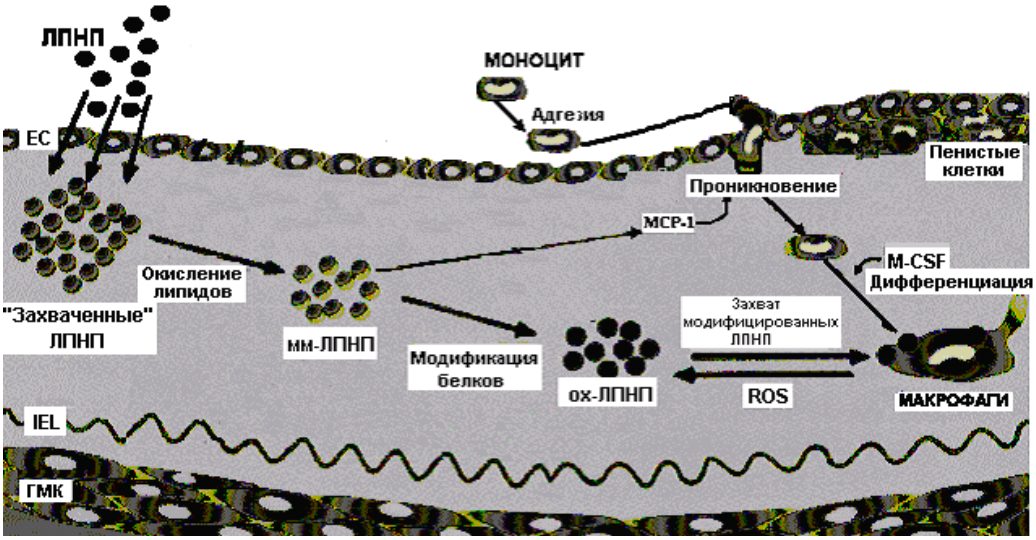

Схема патогенеза атеросклероза (Harrison D.G., 1997):
IEL – внутренняя эластическая ламина; ГМК – гладкомышечные клетки; ROS – активные формы кислорода;
мм-ЛПНП – минимально модифицированные ЛПНП; Ox-ЛПНП – окисленные ЛПНП;
MCP-1 – моноцит-хемотаксический протеин-1; M-CSF – моноцит-колониестимулирующий фактор;
EC – клетки эндотелия

лов, взаимодействовать со свободными радикалами, участвовать в транспорте электронов, связываться с различными ферментами, изменяя их активность. Флавоноиды выступают мощными металл-хелаторами и антиоксидантами, разрушающими цепь свободно-радикальных реакций и снижающими продукцию активных форм кислорода [8, с. 437–446].

Целью работы было изучение влияния растительного флавоноида кверцетина, имеющегося в экстракте курильского чая кустарникового и в экспериментальном препарате СОПКУР, содержащем максимально очищенный концентрат флавоноида, на показатели оксидантно-антиоксидантного статуса при экспериментальной гиперхолестеринемии.

Материалы и методы

Оксидантный статус оценивали по окисленным ЛПНП (оксиЛПНП), которые определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа тест-системами Mercodia Oxidized LDL ELISA на иммуноферментном анализаторе Униплан-Пикон; продукт перекисного окисления – малоновый диальдегид (МДА) – тестом на реактивные вещества тиобарбитурой кислоты фотометрическим методом (наборы реагентов Assay Kit OXY TEK) с измерением оптической плотности на «Фотометре 5010 v5+» при длине волны 530 нм. Антиоксидантный статус регистрировали по общей антиокислительной активности (ОАА) микропланшетным колориметрическим тестом Labor Diagnostika Nord GmbH&Co, KG Nordhom, Germany на иммуноферментном анализаторе Униплан-Пикон, а также по активности каталазы в реакции фермента с метанолом в присутствии оптимальной концентрации перекиси водорода (набор реагентов Cayman).

Работа выполнена на 42 крысах линии Wistar обоего пола массой 170–320 г, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО АН РФ и содержащихся на обычном рационе вивария. Экспериментальная гиперлипидемия вызывалась путем введения крысам всех групп, кроме интактной, перорально зондом в желудок раз в сутки кристаллического холестерина (Fluka, Германия) в дозе 40 мг/кг в 1 мл подсолнечного масла в течение 16 сут. Фармакологическое действие препаратов изучалось в лечебно-профилактическом режиме: параллельно с формированием модельной патологии вводились исследуемые препараты (экстракт курильского чая кустарникового сухой, максимально очищенный флавоноидный препарат курильского чая кустарникового СОПКУР, статины) в виде водной суспензии через зонд в желудок. Крысы были распределены на 7 групп в зависимости от получаемого препарата:

1) интактная (дистиллированная вода в объеме 1 мл);

2) контрольная (холестерин в дозе 40 мг/кг в 1 мл подсолнечного масла);

3) группа, получавшая стандартный препарат группы статинов (холестерин в дозе 40 мг/кг в 1 мл подсолнечного масла и через 2 ч – симвастатин («Симвор», Ranbaxy) в дозе 0,844 мг/кг в 1 мл воды);

4) животные, получавшие холестерин в дозе 40 мг/кг в 1 мл подсолнечного масла и через 2 ч – экстракт курильского чая кустарникового сухой в дозе 50 мг/кг в 1 мл воды;

5) группа, получавшая концентрат флавоноидов курильского чая кустарникового – экспериментальный препарат СОПКУР в дозе 25 мг/кг в 1 мл воды через

2 ч после приема холестерина в дозе 40 мг/кг в 1 мл подсолнечного масла;

6) животные, получавшие холестерин в дозе 40 мг/кг в 1 мл подсолнечного масла и через 2 ч – экстракт курильского чая кустарникового сухой в дозе 100 мг/кг в 1 мл воды;

7) группа, получавшая концентрат флавоноидов курильского чая кустарникового – экспериментальный препарат СОПКУР в дозе 50 мг/кг в 1 мл воды и через 2 ч – холестерин в дозе 40 мг/кг в 1 мл подсолнечного масла.

На 18-й день исследования, после содержания в течение суток на голодной диете, крыс забивали декапитацией с последующим забором крови для определения показателей оксидантно-антиоксидантного статуса.

Результаты исследования

В ходе эксперимента выявлено статистически значимое при $p<0,05$ увеличение уровня МДА в 5 раз в плазме крови крыс контрольной группы по сравнению с интактной. Также значимы при $p<0,05$ различия между контрольной группой и опытными группами животных. Наиболее низкий уровень МДА по сравнению с контрольной группой наблюдался в группе животных, получавших статины (меньше в 3,2 раза), а также в группе, принимавшей препарат СОПКУР в дозе 50 мг/кг, и в группе, получавшей экстракт курильского чая в дозе 100 мг/кг (в 1,7 и 1,6 раза соответственно). В группах животных, получавших препарат СОПКУР в дозе 25 мг/кг и экстракт курильского чая в дозе 50 мг/кг, также зафиксировано снижение уровня МДА по сравнению с контрольной группой в 1,2 и 1,15 раза ($p<0,05$) соответственно (табл. 1).

Уровень оксиЛПНП как еще одного маркера оксидативного стресса в контрольной группе экспериментальных животных был самый высокий по сравнению с интактной (выше в 3,3 раза) и опытными группами. Наиболее низкий уровень оксиЛПНП среди опытных групп наблюдался у животных, принимавших статины, – в 2,9 раза ниже, чем в группе контроля ($p<0,01$). Концентрации оксиЛПНП в крови крыс, получавших препарат СОПКУР в дозах 25 и 50 мг/кг массы тела, были статистически значимо ниже ($p<0,01$), чем в контрольной группе, в 1,2 и 1,8 раза соответственно. В группе крыс, получавших экстракт курильского чая кустарникового в дозе 50 мг/кг и 100 мг/кг, также было зарегистрировано более значительное и достоверное ($p<0,01$) снижение уровня оксиЛПНП – в 1,3 и 2,0 раза соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Влияние экстракционных препаратов курильского чая кустарникового на уровни МДА и окисленных ЛПНП (X±m)

Группа наблюдения	Доза (мг/кг)	Количество животных	МДА, нмол/мл	оксиЛПНП, ЕД/л
1. Интактная	-	6	0,7±0,03	59±3,99
2. Контрольная	-	6	3,5±0,27*	196±2,57**
3. Статины	0,844	6	1,1±0,17*	68±2,29**
4. Экстракт	50	6	3,0±0,08*	172±7,25**
5. СОПКУР	25	6	2,9±0,11*	163±2,71**
6. Экстракт	100	6	2,2±0,12*	100±3,56**
7. СОПКУР	50	6	2,1±0,08*	110±4,17**

Примечание: * – различия достоверны при $p<0,05$,** – различия достоверны при $p<0,01$.

Таким образом, уровень МДА в сыворотке крови животных, получавших препарат группы статинов, и в группах на препарате СОПКУР в дозе 50 мг/кг и 100 мг/кг, экстракте курильского чая сухого был снижен более значительно по сравнению с контрольной группой и группами на исследуемых препаратах в меньших дозах. Максимальное снижение уровня оксиЛПНП наблюдается также в крови животных на статинах и в группах, получавших препарат СОПКУР в дозе 50 мг/кг, 100 мг/кг экстракта курильского чая сухого.

Антиоксидантный статус крови крыс определяли по активности важнейшего внутриэритроцитарного энзима каталазы, катализирующей реакцию разрушения перекиси водорода. Кроме того, выявляли интегративный показатель ОАА, отражающий активность не только внутриклеточных антиоксидантных энзимов, но и неферментных антиоксидантов организма.

В контрольной группе экспериментальных животных был наиболее низкий уровень активности каталазы по сравнению с интактной (ниже в 4,3 раза) и опытными группами ($p<0,01$). В группе животных, принимавших статины, наблюдался самый высокий уровень каталазы среди опытных групп по сравнению с контрольной (в 3,9 раза выше), при этом различия оказались статистически значимы ($p<0,01$). Уровни активности каталазы в крови крыс, получавших препарат СОПКУР в дозах 25 и 50 мг/кг массы тела, были достоверно выше ($p<0,01$), чем в контрольной группе, – в 1,4 и 2,4 раза соответственно. В группе животных

на экстракте курильского чая кустарникового сухого в дозах 50 и 100 мг/кг также было зарегистрировано увеличение активности каталазы в 1,3 и 2,3 раза ($p<0,01$) соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Влияние экстракционных препаратов курильского чая кустарникового на уровни КАТ и ОАА (X±m)

Группа наблюдения	Доза (мг/кг)	Кол-во животных	КАТ, нмоль/мин/мл	ОАА, ммоль/л
1. Интактная	-	6	3,0±0,35	2,0±0,18
2. Контрольная	-	6	0,7±0,05**	0,6±0,04**
3. Статины	0,844	6	2,7±0,2**	1,7±0,3**
4. Экстракт	50	6	0,9±0,11**	0,9±0,05**
5. СОПКУР	25	6	1,0±0,07**	0,8±0,07**
6. Экстракт	100	6	1,6±0,23**	1,2±0,10**
7. СОПКУР	50	6	1,7±0,27**	1,2±0,04**

Примечание: ** – различия достоверны при $p<0,01$.

Полученные данные также свидетельствуют о том, что в контрольной группе экспериментальных животных был наиболее низкий уровень ОАА по сравнению с интактной (ниже в 3,3 раза) и опытными группами. Причем наиболее высокий уровень ОАА среди опытных групп по сравнению с контрольной наблюдался в группе, принимавшей статины (в 2,9 раза выше). Уровень ОАА в крови групп животных на препарате СОПКУР в дозах 25 и 50 мг/кг массы тела был выше, чем в контрольной группе, в 1,3 и 2 раза соответственно. В группе, получавшей экстракт в дозе 50 и 100 мг/кг массы тела, также было зарегистрировано увеличение уровня ОАА – в 1,5 и 2 раза соответственно.

Таким образом, определяется максимальное увеличение уровня активности каталазы и ОАА в сыворотке крови животных на статине, препарате СОПКУР в дозе 50 мг/кг. Аналогичный СОПКУРу (50 мг/кг) эффект наблюдался в группе, получавшей 100 мг/кг экстракта курильского чая сухого, различие данных показателей не превышало ошибки опыта.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработки комплексных лекарственных препаратов на основе пятилистника кустарникового, или курильского чая, фармакотерапевтическая эффективность которого заключается в нормализации нарушений оксидантно-антиоксидантного статуса при экспериментальной гиперхолестеринемии, что обусловлено, по-видимому, наличием в данном растительном сырье флавоноида – кверцетина.

Библиографический список

1. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. Смертность от сердечно-сосудистых и других хронических неинфекционных заболеваний среди трудоспособного населения России // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2002. – №3.

2. Getz G.S. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Immunefunction in atherogenesis // Lipid Res. – 2005. – Vol. 46.

3. Grote K., Flach D., Luchtefeld M. et al. Mechanical stretch enhances MRNA expression and proenzyme release of matrix mettalloproteinase-2 via NAD (1)H oxidase – derived reactive oxygen species // Circ. Res. – 2003. – Vol. 92.

4. Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: does the actual knowledge justify a clinical approach / De Rosa S., Cirillo P., Paglia A., Sasso L., Di Palma V., Chiariello M. // Curr. Vasc. Pharmacol. – 2010. – Vol. 8, №2.

5. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: an update // Atherosclerosis Beyond Cholesterd. – Hanover, 1992.

6. Harrison D.G. Endothelial function and oxidant stress // Clin. Cardiol. – 1997. – Vol. 20. – Suppl. II.

7. Adachi T., Yamada H., Hara H., Futenma A., Kakumu S. Increase of urinary extracellular-superoxide dismutase level correlated with cyclic adenosine monophosphate. FEBS Letters 458(3), 1999.

8. Carroll K.K., Guthrie N., So F.V., Chambers A.F. Anticancer properties of flavonoids, with emphasis on citrus flavonoids // Flavonoids in Health and Disease / eds C.A. Rice-Evans, L. Packer. Marcel Dekker Inc. – N.Y., 1998.