

ВЛИЯНИЕ БИОФЛАВОНОИДОВ НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНЫЕ СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ОСТРОМ АЛКОГОЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ

Е. Г. Доркина, Е. О. Сергеева, Э. Т. Оганесян, Е. П. Парфентьева, Л. А. Саджая, А. Ю. Терехов,
И. В. Скульте, И. В. Духанина, О. М. Шаренко, О. А. Андреева
Пятигорская государственная фармацевтическая академия

Лечебно-профилактическое введение биофлавоноидов гесперидина, диосмина, флавицина и кверцетина в дозах 100 мг/кг при алкогольном отравлении у крыс способствовало восстановлению нарушенного антиоксидантного равновесия и защищало печень от токсического действия этанола. Наиболее выраженное гепатопротекторное действие выявлено у флавицина, введение которого одновременно оказалось нормализующее влияние на содержание перекисных продуктов, предотвращало снижение содержания восстановленного глутатиона, повышало активности супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы и НАДФН-редуктазы в печени.

Ключевые слова: алкогольное отравление, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, биофлавоноиды.

INFLUENCE OF BIOFLAVONOIDS ON THE LIPID PEROXIDATION AND LIVER ANTIOXIDANT SYSTEMS UPON ACUTE ALCOHOLIC INTOXICATION IN RATS

E. G. Dorkina, E. O. Sergeeva, E. T. Oganesyan, E.P. Parfentieva, L. A. Sadjaya, A. Yu. Terekhov,
I. V. Dukhanina, O. M. Sharenko, O. A. Andreeva

Abstract. Hepatoprotective action of bioflavonoids (diosmin, hesperidin, flavicin, quercetin) upon the alcohol intoxication in rats was investigated in terms of restoration of efficiency of antioxidant defense systems and the level of lipid peroxidation (LPO). It was established that flavicin was more effective than the other drugs, normalizing the processes of LPO, preventing glutathione depletion, increasing antioxidant enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD), catalase, GSH-PX and NADPH-reductase in the liver.

Key words: alcoholic intoxication, lipid proxidation, antioxidant system, bioflavonoids

Одним из основных гепатотоксических эффектов ацетальдегида, образующегося в печени из этанола под воздействием алкогольдегидрогеназы и системы этанолового микросомального окисления, является усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ). Биофлавоноиды, являющиеся природными антиоксидантами, могут явиться эффективными средствами для предупреждения токсического действия этанола на печень.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить роль коррекции гесперидином, диосмином, флавицином и кверцетином антиоксидантной системы печени для нормализации интенсивности ПОЛ и защиты печени от токсического действия этанола.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Гесперидин – 7-О-рамноглюкозид гесперидина – выделяли из кожуры цитрусовых [2], диосмин – 7-О-рамноглюкозид диосметина – из *Vicia tanuifolia (variabilis)* Roth [3], флавицин – смесь 7-О-ксилозил и 7-О-арабинозилглюкозидов диосметина – из *Vicia truncatula* [1]. Для сравнения использовали хорошо изученный биоанток-

сидант кверцетин фирмы "Merk". Эксперимент проводили на белых беспородных крысах массой 170–190 г, находившихся на стационарном режиме вивария.

Контрольным крысам в течение 7 дней вводили спирт этиловый в дозе 7,5 мл на массы тела животного внутрибрюшинно в виде 33%-го водного раствора 2 раза в сутки. Биофлавоноиды в дозах 100 мг/кг вводили крысам опытных групп перорально за 5 дней до и на фоне введения спирта этилового. Контрольные животные получали *per os* такой же объем растворителя. Забой животных проводили путем декапитации через сутки после последнего введения.

Для оценки интенсивности ПОЛ определяли содержание ТБК-активных продуктов в гомогенате печени [14] и сыворотке крови [15], диеновых конъюгатов (ДК) в печени [8] и измеряли интенсивность спонтанного и Fe^{2+} -аскорбат-индексированного ПОЛ в постъядерной фракции печени (ПФП) по накоплению МДА. Состояние антиоксидантной системы (АОС) печени оценивали по содержанию восстановленного глутатиона (GSH) [7], активности каталазы [6], супероксиддисмутазы (СОД) [10] и глутатионпероксидазы (ГП), а так-

же определяли НАДФН-редуктазные активности при использовании в качестве субстратов мала-та, глюкозо-6-фосфата и изоцитрата [8]. Для оценки степени поражения печени в сыворотке крови определяли активности аланинаминотрансферазы (АлАт) по методу S. Reitman и S. Frankel, щелочной фосфатазы (ЩФ) – по ме-тоду Бессея, Лоури, Брука и содержание общего билирубина – по методу Йендрашика [5] с ис-пользованием стандартных наборов реактивов "LaChema". В печени определяли содержание триглицеридов (ТРГ) по S. P. Gottfried, B. Rosenberg [5], содержание гликогена [13], общих фос-фолипидов по количеству неорганического фос-фата [5] и в сыворотке крови – активность фос-фолипазы А (ФЛ-А) – по скорости гидролиза фосфатидилхолина [9]. Белок определяли по ме-тоду Лоури и соавт. в модификации Миллера [12]. Данные обрабатывали методом вариацион-ной статистики с расчетом *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что острое алкогольное от-равление сопровождалось повышением активно-сти АлАт на 166%, ЩФ – на 101%, ФЛ-А – на 288%, содержания общего билирубина на 111%, а в печени отмечался значительный рост содер-жания триглицеридов на 267% при одновремен-ном снижении содержания общих фосфолипидов на 43% и гликогена на 55%. Под влиянием всех изученных биофлавоноидов в сыворотке крови отмечались нормализация активности АлАт и со-держания общего билирубина, а также полная нормализация содержания ТРГ в печени, по-скольку эти показатели у крыс опытных групп достоверно не отличались от таковых у интакт-ных животных. В отношении же таких показате-лей, как содержание ФЛ в печени и активности ЩФ в сыворотке крови, их полная нормализация наблюдалась только у крыс, получавших флави-цин, у крыс же других опытных групп эти показа-тели достоверно не отличались от контроля. Со-держание гликогена в печени нормализовалось у животных, получавших не только флавицин, но и диосмин; у крыс, получавших гесперидин и кверцетин, количество гликогена в печени досто-верно не отличалось от контрольного уровня. Снижение же активности ФЛ-А в сыворотке крови по сравнению с контролем наблюдалось под влиянием всех изученных биофлавоноидов, при этом введение флавицина, диосмина и кверце-тина привело к полному восстановлению актив-ности этого фермента до интактного значения, но у крыс, получавших гесперидин, активность ФЛ-А достоверно отличалась от уровня интактных жи-вотных, хотя и была ниже, чем в контроле на 57%.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, у крыс с острым алкогольным отравле-нием наблюдалось достоверное снижение со-держания ТБК-активных продуктов и ДК в печени

на 70 и 55% соответственно, но было повышено содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови на 114%. Одновременно регистрировалось снижение интенсивности индуцированного ПОЛ на 35%, но уровень спонтанного ПОЛ достоверно не отличался от нормы. При этом наблюдалось снижение содержания в печени GSH на 48%, значительное падение активности основных антирадикальных и антиперекисных ферментов, та-ких как СОД (–41%), каталаза (–50%) и ГП (–51%), а также уменьшение на 43% общей НАДФН-редуктазной активности, т. е. все перечислен-ные показатели АОС были снижены практиче-ски в 2 раза.

После предварительного введения флави-цина у крыс с алкогольной интоксикацией отме-чалась полная нормализация содержания ТБК-активных продуктов в крови и печени, содержа-ния ДК в печени, интенсивности индуцированно-го ПОЛ и некоторое повышение интенсивности спонтанного ПОЛ. При введении гесперидина, диосмина и кверцетина содержание ТБК-актив-ных продуктов в печени и крови и уровень спон-танного ПОЛ достоверно не отличались от ин-тактных значений, но содержание в печени ДК и интенсивность индуцированного ПОЛ остались на том же уровне, что и у животных контрольной группы. Под влиянием гесперидина произошла полная нормализация активности СОД и катала-зы, достоверно увеличились НАДФН-редуктазная активность и уровень GSH на 58 и 19% соотве-тственно, но активность ГП осталась на уровне контроля. Под влиянием диосмина помимо СОД и каталазы нормализовалось содержание GSH в печени и в большей степени (+96%) увеличи-лась активность НАДФН-редуктазы, но актив-ность ГП также не отличалась от контрольного уровня, что отмечалось и при введении кверце-тина, которое привело к полной нормализации таких показателей, как активность СОД и со-держание GSH, к повышению активности каталазы на 45%, а НАДФН-редуктазной активности – на 65%. В отличие от этого под влиянием флавици-на и содержание GSH, и активности СОД, ката-лизы и ГП, а также НАДФН-редуктазная актив-ность, т.е. все изученные компоненты АОС пе-чени, увеличились по сравнению с контролем в наибольшей степени и достигли уровня интакт-ных крыс.

Таким образом, нами показано, что острое ал-кохольное отравление сопровождалось значитель-ными изменениями со стороны биохимических по-казателей печени, характеризующих развитие жи-ровой дистрофии, синдромов цитолиза и холеста-за, нарушение углеводного и липидного обменов. При этом выявлено угнетение как антиоксидантной защиты, так и окислительных процессов, что, веро-ятно, можно расценивать как свидетельство доста-точно тяжелого состояния животных и развития де-компенсации в системе ПОЛ/АОС [4, 11].

Изменение показателей ПОЛ и АОС печени крыс при остром алкогольном отравлении и при введении биофлавоноидов ($n = 4-6$)

Показатели	Группы животных					
	Интактные	Контроль	Гесперидин, 100 мг/кг	Диосмин, 100 мг/кг	Флавицин, 100 мг/кг	Кверцетин, 100 мг/кг
ТБК-активные продукты сыв. крови, мкмоль/л	1,2±0,09	2,6±0,58 ⁺ +114%	1,2±0,31* -55%	1,1±0,19* -57%	1,0±0,19* -60%	1,5±0,33* -42%
ТБК-активные продукты печени, нмоль/мг белка	0,18±0,034	0,05±0,013 ⁺ -70%	0,15±0,024* +173%	0,18±0,022** +230%	0,18±0,029** +231%	0,15±0,014** +179%
ДК печени, нмоль/мг белка	3,1±0,32	1,4±0,31 ⁺ -55%	1,3±0,56 ⁺	1,8±0,27 ⁺	2,2±0,22* +60%	1,4±0,23 ⁺
ПОЛ I ПФП, нмоль МДА/мг белка	9,4±0,57	6,09±0,41 ⁺ -35%	4,6±1,03 ⁺	5,0±0,47 ⁺	10,5±1,48* +72%	5,1±0,58 ⁺
ПОЛ II ПФП, нмоль МДА/мг белка	0,9±0,12	1,1±0,33	0,7±0,11	0,9±0,28	2,2±0,45** +99%	1,4±0,34
GSH, мг/г	2,5±0,22	1,3±0,05 ⁺ -48%	1,5±0,01** +19%	2,5±0,11** +93%	2,9±0,17** +127%	2,2±0,07** +67%
СОД ПФП, уд.акт/мг белка	49,3±2,90	29,3±4,00 ⁺ -41%	46,0±2,90* +57%	48,1±4,80* +64%	48,3±1,64* +65%	43,5±2,70* +48%
Катализаза ПФП, уд. акт/мг белка	0,22±0,010	0,11±0,012 ⁺⁺ -50%	0,21±0,020* +96%	0,22±0,019** +96%	0,19±0,010** +78%	0,16±0,003*** +45%
ГП ПФП, нмоль НАДФН / мин/мг белка	276,0±25,59	135,3±25,04 ⁺ -51%	182,8±7,16	185,0±26,68	313,0±27,51* +131%	178,3±24,23
НАДФН-редуктазная активность ПФП, нмоль НАДФН / мин/мг белка	54,4±2,81	21,8±1,51 ⁺⁺ -60%	34,4±1,89** +58%	42,7±0,99** +96%	50,0±2,31* +129%	36,0±1,73** +65%

* – $p < 0,05$ в сравнении с интактными животными; ** – $p < 0,01$ в сравнении с интактными животными; * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем; ** – $p < 0,01$ в сравнении с контролем.

Среди изученных биофлавоноидов наиболее эффективное сохранение нормального уровня ПОЛ и активности основных компонентов эндогенной АОС печени обеспечивал флавицин, введение которого в большей степени, чем применение других флавоноидов, оказалось гепатозащитное действие при алкогольной интоксикации, поскольку в результате его лечебно-профилактического применения выявлена нормализация всех изученных биохимических показателей печени.

Исходя из полученных нами данных, можно сделать вывод, что усиление внутренних резервов антиоксидантной защиты при применении биофлавоноидов является существенным моментом для сохранения в печени про-/антиоксидантного равновесия и ее защиты в условиях острого алкогольного отравления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Острое алкогольное отравление приводит к нарушению в про-/антиоксидантной системе печени и к развитию поражения этого органа.

2. Наиболее эффективное нормализующее влияние на интенсивность ПОЛ и собственную антиоксидантную систему на фоне острого алкогольного отравления оказывает флавицин, что сопровождается его более выраженным гепатозащитным действием.

ЛИТЕРАТУРА

- Андреева О. А., Ивашев М. Н., Озимина И. И. и др. // Хим.-фармац. журн. – 1998. – Т. 32, № 11. – С. 28–30.
- Доркина Е. Г., Оганесян Э. Т., Хочава М. Р. и др. Выделение гесперидина и суммарной флавоноидной фракции из отходов цитрусовых и экспериментальное изучение их использования в качестве гапатозащитных средств. – Пятигорск, 2002. – 31 с. – Деп. В ВНИИТИРАН 11.07.2002. № 1308-В2002.
- Ивашев М. Н., Андреева О. А., Бандюкова В. А. и др. // Хим.-фармац. журн. – 1995. – Т. 29, № 9. – С. 39–41.
- Калянова Н. А. // Токсикол. вестник. – 2002. – № 6. – С. 18–22.
- Колб В. Г., Камышников В. С. Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – 336 с.
- Королюк М. А., Иванова Л. И., Майорова И. Г. и др. // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
- Методы биохимических исследований / Под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. – 272 с.
- Современные методы в биохимии / Под ред. В. Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 392 с.
- Тужилин С. А., Салуэнья А. И. // Лаб. дело. – 1975. – № 6. – С. 334–335.
- Чумаков В. Н., Осинская Л. Ф. // Вопр. мед. химии. – 1977. – № 5. – С. 712–716.
- Широбокова Л. П., Шаяхметова А. М., Макаренко А. Н. // Токсикол. вестник. – 2003. – № 2. – С. 6–8.
- Miller G. L. // Anal. Biochem. – 1959. – Vol. 35, № 5. – P. 964–966.
- Montgomery R. // Arch. Biochem. Biophys. – 1957. – Vol. 67, № 2. – P. 378.
- Ohkawa H., Ouchihi N., Vagi K. // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 95, № 2. – P. 351–358.
- Uchiyama M., Mihara M. // Anal. Biochem