

УДК 615.322:612.396.22:616.36-002-092.9

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ГЕПАТОЗАЩИТНОЙ АКТИВНОСТИ
ФЛАВОНОИДОВ ПРИ КУРСОВОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ У КРЫС**

*Е.О. Сергеева, Е.Г. Доркина, Л.А. Саджая, И.В. Скульте, О.М. Шаренко,
И.М. Деревенец*

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ
Минздрава России, г. Пятигорск

E-mail: maklea@yandex.ru

Злоупотребление алкоголем широко распространено и представляет важную медицинскую и социальную проблемы во всем мире, особенно в США и в странах Европы, в том числе в России. Алкоголь оказывает отрицательное действие на все органы, однако печень наиболее подвержена его влиянию, поскольку именно здесь происходит окисление этанола. В опытах на белых беспородных крысах-самках на модели курсовой алкоголизации исследовано гепатозащитное действие лечебно-профилактического применения диосмина и флавицина в сравнении с кверцетином по способности нормализовать биохимические показатели функционального состояния печени. Установлено, что более выраженным гепатозащитным действием обладает флавицин в дозе 100 мг/кг. Вероятно, это связано с большей биодоступностью данного соединения, которую обеспечивает углеводный компонент, а также с наличием C₂-C₃ двойной связи в молекуле диосметина, в виде которого данное соединение проявляет активность *in vivo*.

Ключевые слова: флавоноиды, гепатозащитное действие, алкоголь.

**COMPARATIVE VALUATION OF HEPATOPROTECTIVE ACTIVITY OF
FLAVONOIDS IN COURSE ALCOHOLIZATION OF RATS**

E.O. Sergeeva, E.G. Dorkina, L.A. Sadzhaya, I.V. Skulte, O.M. Sharenko, I.M. Derevenets

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of Volgograd State Medical
University

E-mail: maklea@yandex.ru

Alcohol abuse is widespread and is a serious medical and social problem throughout the world especially in the USA and Europe countries including Russia. Alcohol influences negatively all organs. However liver is the most amenable to its action, because it is in liver where oxidation of ethanol takes place. In the experiments on white outbreed female rats hepatoprotective action of medical and preventive application of diosmin and flavicin in comparison with quercetine by the capacity of biological indices of functional liver state normalization on the model of course alcoholization. We have established that flavicin at a dose of 100 mg/kg has the most signified hepatoprotective action. This is probably connected with high bioaccessibility of this compound which is provided by carbohydrate component and C₂-C₃ linking in diosmin molecule in the form of which this compound exhibits activity *in vivo*.

Keywords: flavonoids, hepatoprotective action, alcohol.

Злоупотребление алкоголем представляет серьезную медицинскую и социальную проблему. Увеличение приема алкоголя наблюдается во всем мире, в том числе и в России. Алкоголь оказывает отрицательное действие на все органы, однако печень наиболее подвержена его влиянию, поскольку именно здесь происходит окисление этанола. Около 85% этанола окисляется алкогольдегидрогеназой (АДГ) желудка и печени до ацетальдегида. Систематическое употребление алкоголя снижает активность АДГ и повышает уровень его основного токсического метаболита. Этанол и ацетальдегид оказывают повреждающее действие на гепатоциты, вызывая разрушение мембран, некроз, увеличение синтеза триглицеридов и их отложение в гепатоцитах, ингибируют синтез альбумина, нарушают обезвреживающую функцию печени по отношению к экзогенным и эндогенным токсинам, стимулируют усиление перекисного окисления липидов, процессы фиброгенеза и канцерогенеза [7]. В настоящее время наиболее часто в качестве гепатопротекторов используют препараты растительного происхождения [2, 5]. Перспективными соединениями в качестве гепатопротекторов следует считать флавоноиды, обладающие низкой токсичностью и широким спектром фармакологической активности. В этом плане представляет интерес изучение растений рода Вика, относящихся к широко распространенным на Северном Кавказе кормовым растениям и характеризующихся высоким содержанием флавоноидов [3, 4]. Целью нашего исследования явилась сравнительная оценка гепатозащитной активности флавоноидов растений рода Вика при курсовой алкоголизации у крыс.

Объектами исследования служили флавицин и диосмин, выделенные из растительного сырья на кафедре органической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ под руководством доктора фармацевтических наук, профессора Э.Т. Оганесяна и кверцетин фирмы Merck, являющийся одновременно и веществом сравнения. Диосмин был выделен из надземной части вики изменчивой – *Vicia tanuifolia (variabilis) Roth*, собранной в период цветения, как описано в [1]. Для этого обезжиренное с помощью хлороформа воздушно-сухое сырье обрабатывали водным этанолом и далее диосмин из сырья извлекали диметилсульфоксидом (ДМСО). Идентификацию проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), бумажной хроматографии (БХ), УФ- и ИК-спектроскопии: температура плавления (т. пл.) 290-293 °С (из смеси ДМСО-метанол); R_f 0,39; УФ-спектр, λ_{max} , нм: (в C_2H_5OH) 345, 254; ИК-спектр, cm^{-1} : 1605, 1510, 1450 (-C=C ароматического ядра), 2983 (-OCH₃), 3250 (-OH), 1650 (C=O), что свидетельствует о принадлежности выделенного соединения к диосмину, который относится к флавонам и представляет собой 7-О-рамноглокозид диосметина. Последний, в свою очередь, является 5,7,3'-тригидрокси-4'-метоксифлавоном.

Сумма дигликозидов диосметина, обозначенная как флавицин, – смесь 7-О-ксилозил- и 7-О-арабинозилглюкозидов диосметина – была выделена из надземной части вики обрубленной *Vicia truncatula*, как описано в [8]. Воздушно-сухое сырье экстрагировали 30-50% этанолом, флавоноидные соединения выделяли с помощью колоночной хроматографии и идентифицировали ТСХ, БХ, УФ и ИК спектроскопией. 7-О-ксилозилглюкозид диосметина: т. пл. 243-245 °С (из водного этанола); R_f 0,48; УФ спектр, λ_{max} , нм: (в C_2H_5OH): 253, 345; ИК-спектр, cm^{-1} : 3600-3200 (-OH), 2920 (-OCH₃), 1645 (C=O), 1600, 1495 (-C=C ароматического ядра), 1080, 950, 855, 780 (замещение в фенольном радикале).

Исследования были проведены на белых беспородных крысах-самках массой 180-200 г. Животные получены из питомника ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ, прошли двухнедельный карантин и содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении. Курсовую алкоголизацию проводили путем 2-кратной внутрибрюшинной инъекции 33% раствора этанола в сутки в дозе 0,75 мл/100 г массы тела животного в течение 7 дней [7]. Изучаемые флавоноиды в дозе 100 мг/кг животные

получали за 5 дней до введения этанола, а затем совместно с ним. Контролем служили животные, которым вводили такой же объем растворителя.

Эффективность гепатозащитного действия флавоноидов изучали по комплексу биохимических показателей: активности аланинаминотрансферазы (АлАт), щелочной фосфатазы (ЩФ), кислой фосфатазы (КФ), фосфолипазы А₂ (ФЛ-А₂), общего билирубина (ОБ), глюкозы и триглицеридов (ТГ) в сыворотке крови и содержанию гликогена, ТГ, фосфолипидов (ФЛ), 5'-нуклеотидазы в гомогенате печени [6]. Данные обрабатывали методом вариационной статистики с расчетом t-критерия Стьюдента.

При 7-дневной алкоголизации у крыс наблюдалась резкая активация фосфолипаз, развитие повреждения и нарушение проницаемости клеточных и субклеточных мембран (развитие синдрома цитолиза), снижения содержания ФЛ в печени, развитие жирового перерождения, синдрома холестаза, нарушение желчсекреторной и гликогенсберегающей функций печени (табл. 1). Применение флавоноидов привело к эффективному торможению фосфолипаза и цитолиза, а именно, к полной нормализации активностей АлАт и ФЛ-А₂ в сыворотке крови, которые снижались по сравнению с нелечеными животными при введении диосмина – на 60% и 77%, флавицина – на 63% и 89% (что было даже достоверно ниже, чем у интактных животных на 57%), кверцетина – на 59% и 81% соответственно. Применение флавицина привело также к снижению активности ЩФ в сыворотке крови на 68% по сравнению с контролем, что также было достоверно ниже, чем у интактных крыс на 35%, но введение остальных флавоноидов не оказало влияния на активность данного фермента, которая осталась такой же повышенной, как и в контроле. Содержание же общего билирубина при введении всех исследуемых флавоноидов: диосмина, флавицина и кверцетина достоверно снижалось на 37%, 29% и 51% соответственно по отношению к контролю и под влиянием диосмина и кверцетина достигло нормальных значений. Под влиянием флавицина и кверцетина достоверно увеличилось по отношению к контролю содержание глюкозы в сыворотке крови (т.е. устранялась гипогликемия, вызванная введением этанола) на 88% и 60% соответственно и достигло уровня нормы, но применение диосмина не повлияло на этот показатель, который оставался сниженным, как и в контроле. Наблюдалась полная нормализация в сыворотке крови активности лизосомального фермента КФ под влиянием всех исследуемых флавоноидов, которая была повышена у животных при алкоголизации, а у крыс, которым вводили флавицин, она оказалась и достоверно ниже на 25%, чем у интактных животных.

Таблица 1 – Влияние флавоноидов на биохимические показатели состояния печени у крыс при курсовой алкоголизации (n=6)

Показатели	Интактные	Контроль (33% раствор спирта этилового)	Диосмин, 100 мг/кг	Флавицин, 100 мг/кг	Кверцетин, 100 мг/кг
1	2	3	5	6	7
АлАт сыворотки крови, мккат/л	0,47 ±0,053	1,25 ±0,127 P _и <0,001 +166%	0,50 ±0,071 P _к <0,001 -60% P _и >0,1	0,46 ±0,047 P _к <0,001 -63% P _и >0,1	0,52 ±0,045 P _к <0,005 -59% P _и >0,1
ЩФ сыворотки крови, Ед/л	128 ±6,4	258 ±32,0 P _и <0,001 +101%	177 ±13,0 P _к >0,1 P _и <0,001 +38%	83 ±8,4 P _к <0,001 -68% P _и <0,001 -35%	226 ±14,5 P _к >0,1 P _и <0,001 +77%

Продолжение таблицы 1

1	2	3	5	6	7
Общий билирубин сыворотки крови, мкмоль/л	6,4±0,68	13,4 ±1,22 P _и <0,001 +111%	8,4±0,98 P _к <0,05 -37% P _и >0,1	9,5±0,64 P _к <0,05 -29% P _и <0,05 +48%	6,6±0,66 P _к <0,01 -51% P _и >0,1
Триглицериды сыворотки крови, ммоль/л	0,6 ±0,07	1,4 ±0,07 P _и <0,001 +133%	0,7 ±0,07 P _к <0,001 -50% P _и >0,1	0,6 ±0,09 P _к <0,001 -57% P _и >0,1	0,7 ±0,02 P _к <0,001 -50% P _и >0,1
Глюкоза сыворотки крови, ммоль/л	10,7 ±1,62	4,8 ±0,83 P _и <0,05 -55%	6,5 ±0,06 P _к >0,05 +35% P _и <0,05 -39%	9,0 ±0,54 P _к <0,005 +88% P _и >0,1	7,7 ±0,50 P _к <0,05 +60% P _и >0,1
Кислая фосфатаза сыворотки крови, Е/л	44,8±1,99	79,09±5,44 P _и <0,01 +77%	47,1±3,91 P _к <0,01 -40% P _и >0,1	33,6±3,39 P _к <0,01 -57% P _и <0,05 -25%	44,8±3,43 P _к <0,001 -43% P _и >0,1
ФЛ А₂ сыв. крови, Ед/л	353±46,4	1367±319 P _и <0,001 +288%	314±12,8 P _к <0,005 -77% P _и >0,1	153±18,0 P _к <0,005 -89% P _и <0,05 -57%	266±13,5 P _к <0,05 -81% P _и >0,1
5'-нуклеотидаза печени, мкг P_и/мг белка	171,6±16,33	85,3±18,54	135,5±21,06 P _к >0,1 P _и <0,05 -21%	152,7±16,64 P _к <0,05 +79 % P _и >0,1	129,7±18,09 P _к >0,1 P _и <0,05 -24%
Фосфолипиды печени, мг/г	28,4 ±2,06	16,2 ±3,19 P _и <0,05 -43%	20,7 ±1,34 P _к >0,1 P _и <0,01 -27%	30,1 ±2,40 P _к <0,01 +86% P _и >0,1	20,1 ±2,66 P _к >0,1 P _и <0,01 -29%
Гликоген печени, г/кг	18,8±1,80	8,5±0,54 P _и <0,005 -55%	14,6±1,58 P _к <0,05 +71% P _и >0,1	16,6±1,00 P _к <0,001 +96% P _и >0,1	9,1±2,32 P _к >0,1 P _и <0,005 -52%
ТРГ печени, мкмоль/г	24,2±3,80	88,9±4,50 P _и <0,001 +267%	17,6±2,41 P _к <0,001 -80% P _и >0,1	15,2±1,18 P _к <0,001 -83% P _и >0,05	15,7±1,12 P _к <0,001 -82% P _и >0,1

Примечание: P_и – уровень достоверной разницы по отношению к интактным значениям; P_к – уровень достоверной разницы по отношению к контрольным значениям; n – количество животных в группе

В печени при применении всех флавоноидов полностью нормализовалось содержание ТРГ, т.е. они эффективно сдерживали развитие жировой дистрофии, снижая количество ТРГ примерно в равной степени (-80%, -83% и 82% по сравнению с контролем), содержание же гликогена полностью было восстановлено под влиянием применения диосмина (+71%) и флавицина (+96%), но у животных, получавших кверцетин, оно осталось пониженным и достоверно не отличалось от контрольных значений. Содержание же ФЛ, как и активность плазматической 5'-нуклеотидазы в печени, увеличились только у животных, получавших флавицин (на 86% и 79% по сравнению с контролем) и достоверно не отличались от нормы, в то время как у животных, которым вводили диосмин и кверцетин, эти показатели остались такими же низкими, как и у контрольных животных (достоверные различия отсутствовали).

Если эффективность гепатозащитного действия выразить в баллах, оценивая полную нормализацию 2 баллами, достоверное улучшение – 1 баллом и сохранение на уровне контроля – 0 баллов, то с учетом того комплекса биохимических показателей, который нами был использован для оценки степени нормализации состояния печени (11 показателей), в случае его полной нормализации сумма баллов должна составить 22. При применении диосмина, как и кверцетина, полностью нормализовались 7 показателей, и достоверно не изменились по отношению к контролю 4 показателя, т.е. сумма баллов для обоих составит 14 (64%). При применении флавицина нормализовались 9 показателей и 2 – достоверно улучшались, т.е. его эффективность составляет 20 баллов (91%).

Таким образом, по эффективности гепатозащитного действия при курсовой алкоголизации по комплексу изученных биохимических показателей исследуемые флавоноиды можно расположить следующим образом: *флавицин* > *диосмин* = *кверцетин* (20 баллов – 14 баллов – 14 баллов; 91% – 64% – 64%), т.е. наиболее выраженными гепатопротекторными свойствами обладает флавицин. Поскольку флавицин отличается от самого диосмина лишь углеводным фрагментом, результаты наших исследований свидетельствуют о вкладе данного фрагмента в проявление гепатозащитной активности.

Выводы

Курсовая алкоголизация у крыс сопровождается поражением печени с развитием синдромов цитолиза, холестаза, жировой дистрофии, нарушением углеводного и липидного обменов.

Флавицин обладает более выраженным гепатозащитным действием, чем диосмин и кверцетин при лечебно-профилактическом введении в дозе 100 мг/кг в условиях курсовой алкоголизации. Это может быть связано с большей биодоступностью, которую обеспечивает углеводный компонент, а также с наличием C₂-C₃ двойной связи в молекуле диосметина (агликона флавицина).

Библиографический список

1. Выделение диосмина из растений рода вика и иссопа лекарственного и его влияние на свертывание крови / М.Н. Ивашев [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 1995. – № 9. – С. 39-41.
2. Доркина Е.Г. Изучение гепатозащитного действия природных флавоноидных соединений // Эксперим. и клинич. фармакол. – 2004. – Т.67, № 6. – С. 41-45.
3. Доркина Е.Г. Флавоноиды и окислительный стресс: монография. – Волгоград: Издательство ВолгГМУ, 2014. – 96 с.
4. О биологически активных веществах некоторых представителей рода *Vicia* / Э.Т. Оганесян [и др.] // Современные наукоемкие технологии: сб. науч. тр. – М., 2004. – №6. – С.108-109.

5. Сергеева Е.О. Влияние флавоноидов на механизмы развития окислительного стресса при токсических поражениях печени: Автореф. дис. канд. фармац. наук. – Пятигорск, 2007. – 24 с.

6. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – 392 с.

7. Спрыгин, В.Г. Влияние комплексного полифенольного препарата «Калифен» на процессы восстановления биохимических показателей печени после поражения этиловым спиртом / В.Г. Спрыгин, Н.Ф. Кушнерова // Вопр. биол., мед. и фармац. химии. – 2002. – № 4. – С. 22-26.

8. Сумма гликозидов диосметина вики обрубленной: выделение и изучение биологической активности / О.А. Андреева и др. // Хим.-фармац. журн. – 1998. – Т. 132, №11. – С. 28-30.

Сергеева Елена Олеговна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры биологической химии и микробиологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: биологическая химия, гепатопротекторы растительного происхождения. E-mail: taklea@yandex.ru

Доркина Елена Григорьевна – доктор биологических наук, доцент, зав. кафедрой биологической химии и микробиологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: свободно-радикальные патологии и поиск природных соединений для их коррекции. E-mail: elenadorkina@yandex.ru

Саджая Любовь Анатольевна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры биологической химии и микробиологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: биологическая химия, токсическое повреждение печени. E-mail: belochka794@rambler.ru

Скульте Ирина Валерьевна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры биологической химии и микробиологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: биологическая химия, флавоноиды. E-mail: skultefarm@yandex.ru

Шаренко Оксана Михайловна – кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: органическая химия. E-mail: sharenko_oks@mail.ru

Деревенец Иван Михайлович – студент 3 курса Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: биологическая химия, токсическое повреждение печени. E-mail: derevenetsivan@yandex.ru