

УДК 615.25.252.349.7:615.451.16:582.894.6

В. А. РИБАК, Л. М. МАЛОШТАН

Національний фармацевтичний університет

ВПЛИВ БІОФЛАВОНІДНОГО КОМПЛЕКСУ З КВАСОЛІ НА СТАН КОАГУЛЯЦІЙНОГО ГЕМОСТАЗУ В ІНТАКТНИХ ЩУРІВ І У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВИМ ДІАБЕТОМ

На підставі проведених досліджень виявлено, що використання біофлавоноїдного комплексу з kwasолі та кверцетину в інтактних щурів не сприяло вірогідному впливу на показники коагуляційного гемостазу. У тварин з експериментальним стрептозотоциновим діабетом біофлавоноїдний комплекс з kwasолі та кверцетин нормалізували реологічні властивості крові. Використання в лікуванні ЦД 2-го типу біофлавоноїдного комплексу з kwasолі дасть можливість попередити порушення рівноваги протромботичної і фібринолітичної властивості крові.

Ключові слова: стрептозотоциновий діабет; коагуляційний гемостаз; кверцетин; біофлавоноїдний комплекс з kwasолі

ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) 2-го типу є найбільш розповсюдженим ендокринним захворюванням і причиною мікро- та макроангіопатій [1]. Підвищена активність тромбоцитів – це один з багатьох факторів серцево-судинного ризику при ЦД, одна зі складових розвитку метаболічного синдрому. У хворих з ЦД рівень активаторів тромбоцитів – аденозинтрифосфату і аденозиндифосфату, а також ступінь агрегації тромбоцитів на 18-80 % вище, ніж у здорових осіб [4].

Одним з механізмів підвищення рівня смертності у хворих на ЦД є підвищена схильність до розвитку повторних коронарних синдромів внаслідок характерних для цієї патології порушень коагуляційних властивостей крові [20].

Літературні дані свідчать, що при ЦД 2-го типу активований тромбоцитарний гемостаз, збільшений рівень фібриногену, факторів V, VII, VIII, X зсідання крові. Гіпертригліцеридемія, характерна для метаболічного синдрому, може сприяти пошкодjuвальному впливу на систему гемостазу, пригнічуючи фібриноліз і стимулюючи коагуляцію [12].

Таким чином, важливу роль при ЦД мають порушення функціонально-структурних компонентів гемостазу – тромбоцитарно-судинної ланки і ферментативних систем плазми крові (зсідальної, фібринолітичної, калікреїн-кінінової і комплементу) [18, 20]. Фактори, що сприяють підвищенню активності системи зсідання крові у осіб з порушенням толерант-

ності до вуглеводів: підвищення рівня фактора Віллебранта в плазмі крові, зниження активності тканинного активатора плазміногену, гіперфібриногенемія, підвищення активності ІАП-1, пригнічення фібринолізу, дисфункція ендотелію, підвищення агрегаційної властивості тромбоцитів, тромбофілія [18, 21, 22].

Тому актуальним при виборі антидіабетичних препаратів є не тільки їх гіпоглікемічна активність та безпека, а й екстраглікемічні ефекти – вплив на реологічні властивості крові, зниження факторів ризику кардіоваскулярних захворювань та дисліпидемію.

У якості лікарських засобів використовуються флавоноїди рутин і кверцетин. Флавоноїд кверцетин є природним інгібітором гіалуронідази – ферменту, що підвищує проникність судинної стінки; надає капіляропротекторну дію (зменшує проникність і ламкість капілярів); поліпшує мікроциркуляцію. Вплив кверцетину на рецепторний апарат тромбоцитів веде до зниження активності тромбоксанів; зменшує тромбогенний потенціал кров'яних пластинок [14, 15, 17].

Розробка лікарських препаратів на основі природних біофлавоноїдів, зокрема кверцетину, є перспективним напрямком щодо розширення арсеналу лікарських засобів політропної дії.

Метою роботи було встановлення впливу біофлавоноїдного комплексу з kwasолі на реологічні показники крові в інтактних щурів і у щурів з експериментальним стрептозотоциновим діабетом.

На кафедрі фармакогнозії НФаУ під керівництвом проф. Ковальова В. М. був створений біофлавоноїдний комплекс з kwasолі, до складу якого входять

© Рибак В. А., Малоштан Л. М., 2015

Таблиця 1

ВПЛИВ БІОФЛАВОНІДНОГО КОМПЛЕКСУ З КВАСОЛІ ТА КВЕРЦЕТИНУ НА ПОКАЗНИКИ ЗСІДАННЯ КРОВІ (КОАГУЛЯЦІЙНОГО ГЕМОСТАЗУ) В ІНТАКТНИХ ТВАРИН ($\bar{X} \pm S_x$), (n = 10)

Показники	Інтактний контроль	Кверцетин, 5 мг/кг	Біофлавоноїдний комплекс з kwasолі, 40 мг/кг
Час зсідання крові, с	157,6 ± 1,56	155,5 ± 1,77	153,3 ± 1,33
Час рекальцифікації плазми крові, с	36,8 ± 0,62	34,7 ± 0,16	35,5 ± 0,36
Протромбіновий індекс, с	14,8 ± 0,28	15,8 ± 0,17	15,2 ± 0,10
Фібриноген, г/л	11,2 ± 0,31	10,8 ± 0,15	12,2 ± 0,42

фенольні сполуки, представлені флавонолами, ізофлавонами, ізофлаванонами, ізофлаванами, птерокарпанами, оксикоричними кислотами, кумаринами, амінокислотами.

Раніше проведені фармакологічні дослідження встановили, що біофлавоноїдний комплекс з kwasолі у ЕД₅₀ 40 мг/кг [7] володіє гіпоглікемічною активністю [8], гіполіпідемічними, антиатерогенними, антигіпертензивними та антиоксидантними ефектами [9].

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експериментальні дослідження проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», що відповідають положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) [5].

Вивчення впливу біофлавоноїдного комплексу з kwasолі і референс-препарату кверцетину на показники зсідання крові були проведені в дві серії: у першій серії на інтактних щурах (1 група тварин – інтактний контроль, 2 група отримувала кверцетин, а 3 група – біофлавоноїдний комплекс з kwasолі), а у другій – на щурах з експериментальним стрептозоциновим діабетом (1 група – діабетичний контроль, 2 група тварин отримувала кверцетин, а 3 група – біофлавоноїдний комплекс з kwasолі).

Показниками I, II і III фаз зсідання крові були: час зсідання, час рекальцифікації плазми, протромбіновий час та кількість фібриногену. Швидкість зсідання крові визначали за методом Альтгаузена А. Я. [10] *in vitro*, час рекальцифікації – за методом Бегерхофа з використанням 0,025 М розчину CaCl₂ [13], протромбіновий час – за допомогою набору реактивів «Техпластин-тест», кількість фібриногену досліджували за допомогою набору реактивів «МультиТех-фібриноген» фірми «Технологія-Стандарт» (Росія).

Біофлавоноїдний комплекс з kwasолі у дозі 40 мг/кг і референс-препарат кверцетин у дозі 5 мг/кг (виробник Борщагівський ХФЗ, Україна) вводили перорально тваринам протягом 7 діб. Терапевтична доза кверцетину для щурів перерахована з добової дози для людини за допомогою коефіцієнтів видової чутливості Ю. П. Риболовлева [11].

Нікотинамід вводили внутрішньоочеревинно в дозі 230 мг/кг маси тіла щурів лінії Вістар за 15 хви-

лин до внутрішньовенної ін'єкції стрептозоцину в дозі 65 мг/кг, що призводило до помірної та стабільної гіперглікемії та 40 % збереження запасів панкреатичного інсуліну [19].

Отримані дані обробляли методом варіаційної статистики [6].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Стан нормального гемостазу потребує збереження інтактними трьох компонентів: тромбоцитів, факторів коагуляції і цілісності судинної стінки. У випадку порушення хоча б одного з компонентів активується процес, що призводить до підвищеного тромбоутворення. Численними дослідженнями підтверджено, що при ЦД 1-го та ЦД 2-го типів порушуються всі три складові, необхідні для збереження нормального зсідання крові [2, 12].

Одноразове введення інтактним щурам протягом тижня біофлавоноїдного комплексу з kwasолі в дозі 40 мг/кг і препарату порівняння кверцетину в дозі 5 мг/кг не призводило до статистично значущих змін показників зсідання крові (часу зсідання крові, часу рекальцифікації плазми крові, протромбінового індексу та кількості фібриногену) у порівнянні з показниками інтактних тварин (табл. 1).

При ЦД ендотелій починає активно продукувати речовини, що стимулюють адгезію і агрегацію тромбоцитів (ендотелін-1, тромбоксан А₂, фактор Вільбранда), процес зсідання крові (тканинний тромбопластин), інгібітори фібринолізу – PAI-1 та ін. У результаті тривалого впливу гіперглікемії, гемодинамічних факторів, окиснювального стресу пошкоджується ендотеліальне вистилання судин [16, 23].

У групі щурів з експериментальним стрептозоциновим діабетом відбувалося порушення коагуляційного гемостазу: зменшення часу зсідання крові на 26,7 с та часу рекальцифікації плазми крові на 13,1 с, збільшення протромбінового часу на 4,5 с та гальмування фібриноутворення – збільшення на 5,7 г/л (табл. 2) у порівнянні з показниками інтактних тварин (табл. 1).

Використання у лікуванні діабетичних щурів біофлавоноїдного комплексу з kwasолі у дозі 40 мг/кг і препарату порівняння кверцетину у дозі 5 мг/кг вірогідно збільшувало час зсідання крові на 14,6 с і 6,7 с та час рекальцифікації плазми крові на 8,5 с і 5,9 с,

Таблиця 2

ВПЛИВ БІОФЛАВОНІДНОГО КОМПЛЕКСУ З КВАСОЛІ ТА КВЕРЦЕТИНУ НА ПОКАЗНИКИ ЗСІДАННЯ КРОВІ (КОАГУЛЯЦІЙНОГО ГЕМОСТАЗУ) У ТВАРИН З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВИМ ДІАБЕТОМ ($\bar{X} \pm S_x$), (n = 10)

Показники	Діабетичний контроль	Кверцетин, 5 мг/кг	Біофлавоноїдний комплекс з квасолі, 40 мг/кг
Час зсідання крові, с	126,6 ± 1,71	133,3 ± 2,04 p ₁ < 0,05	141,2 ± 2,79 p ₁ < 0,01, p ₂ < 0,05
Час рекальцифікації плазми крові, с	22,4 ± 0,37	28,3 ± 0,63 p ₁ < 0,001	30,9 ± 0,78 p ₁ < 0,001, p ₂ < 0,05
Протромбіновий індекс, с	19,7 ± 0,45	16,5 ± 0,59 p ₁ < 0,01	14,5 ± 0,60 p ₁ < 0,001, p ₂ < 0,05
Фібриноген, г/л	17,9 ± 0,48	13,1 ± 0,21 p ₁ < 0,001	14,1 ± 0,47 p ₁ < 0,001

Примітки:

- 1) p₁ – значущість змін порівняно з групою «Діабетичний контроль»;
2) p₂ – значущість змін порівняно з групою «Кверцетин».

зменшувало протромбіновий час на 5,2 с і 3,2 с та рівень фібриногену на 3,8 г/л і 4,8 г/л у порівнянні з показниками тварин діабетичного контролю (табл. 2).

На експериментальній моделі стрептозотоцинового діабету у щурів біофлавоноїдний комплекс з квасолі проявив більш виражений вплив, ніж кверцетин на час зсідання крові та час рекальцифікації плазми крові (вищий на 7,9 с і на 2,6 с), протромбіновий час (нижчий на 2,0 с), а за зниженням рівня фібриногену у крові біофлавоноїдний комплекс з квасолі наближався до дії кверцетину.

За літературними даними біофлавоноїд кверцетин сприяє поліпшенню кровообігу, так як перешкоджає згущенню крові, знижуючи вірогідність утворення тромбів, пригнічуючи синтез тромбоксану. У кверцетину виявлені антикоагулянтні властивості, що пояснюють його кардіопротекторну активність. Крім того, кверцетин пригнічує каталітичну активність тромбіну, збільшуючи час рекальцифікації (Znukowa A. V., 1994), відновлює антиоксидантний статус, нормалізує ліпідний обмін при ЦД 1-го і ЦД 2-го типу (Швець М. І., Мазур Л. П., 2006) [3, 14, 15, 17].

Квасолеві стулки містять флавоноїди – похідні кверцетину і кемпферолу: рутину, робінін, кемпферол-3-глюкоронозид, ізокверцитрин. Так як до складу біофлавоноїдного комплексу з квасолі входить рутин, а він є глікозидом кверцетину, поряд з його цукрознижувальною дією встановлено покращення реологічних властивостей крові у щурів з експериментальним стрептозотоциновим діабетом.

ВИСНОВКИ

1. Використання біофлавоноїдного комплексу з квасолі та кверцетину в інтактних щурів не сприяло вірогідному впливу на показники коагуляційного гемостазу.

2. У тварин з експериментальним стрептозотоциновим діабетом біофлавоноїдний комплекс з квасолі та кверцетин нормалізували реологічні властивості крові.
3. Використання в лікуванні ЦД 2-го типу біофлавоноїдного комплексу з квасолі дасть можливість попередити порушення рівноваги протромботичної і фібринолітичної властивості крові.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Аметов А. С. Сердечно-сосудистый риск при сахарном диабете / [А. С. Аметов, Е. Я. Парнес, Н. А. Черикова и др.] // Эндокринология. – 2013. – № 2. – С. 17-26.
2. Баркаган З. С., Момот А. П. Диагностика и контролируемая терапия нарушенной гемостаза. – М.: «Ньюдиамед-АО», 2008. – 292 с.
3. Богачев В. Ю. Биофлавоноиды и их значение в ангиологии. Фокус на диосмин / [В. Ю. Богачев, О. В. Голованова, А. Н. Кузнецова и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2013. – № 19 (1). – С. 73-81.
4. Дедов И. И. Сахарный диабет: [руководство для врачей] / И. И. Дедов, М. В. Шестакова. – М., 2003. – 455 с.
5. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах: [текст] // Эндокринология. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142-145.
6. Иванов Ю. И. Статистическая обработка данных медико-биологических исследований / Ю. И. Иванов, О. Н. Погорелюк. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
7. Рибак В. А. Визначення ефективної дози (ED₅₀) густого екстракту квасолі з потенційними гіпоглікемічними властивостями / В. А. Рибак // Проблеми екол. та мед. генетики і клін. імунол. – 2014. – № 1 (121). – С. 225-230.

8. Рибак В. А. Вивчення впливу густого екстракту квасолі на гостру інсулінову недостатність, викликану антиінсуліновою сироваткою у кролів / В. А. Рибак, Л. М. Малоштан // Проблеми екол. та мед. генетики і клін. імунол. – 2014. – № 2 (122). – С. 172-177.
9. Рибак В. А. Використання біофлавоноїдного комплексу з квасолі для лікування метаболічного синдрому на тлі ожиріння / В. А. Рибак, Л. М. Малоштан // Інформ. лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 279. – К., 2014. – Вип. 35. – 4 с.
10. Руководство к практическим занятиям по физиологии / Под ред. проф. Г. И. Косицкого и проф. В. А. Полянцева. – М.: Медицина, 1988. – С. 142-143.
11. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константе биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев // Журн. АН СССР. – 1979. – Т. 247, № 6. – С. 1513-1516.
12. Сахарный диабет 2 типа: скрининг и факторы риска / [Н. А. Кравчун, А. В. Казаков, Ю. И. Караченцев и др.]. – Х.: Новое слово, 2010. – 256 с.
13. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Под ред. проф. Е. А. Коста. – М.: Медицина, 1975. – 383 с.
14. Флавоноид кверцетин мощное оружие против комплекса болезней цивилизации // Природ. медицина. – 2013. – № 1 (13). – С. 6-9.
15. Шимановский Н. Л. Перспективы применения препаратов кверцетина для профилактики и лечения атеросклероза / Н. Л. Шимановский, А. И. Матюшин, В. С. Роговский // Природ. медицина. – 2014. – № 2 (14). – С. 66-69.
16. Azuma K. Repetitive fluctuations in blood glucose enhance monocyte adhesion to the endothelium of rat thoracic aorta / [K. Azuma, R. Kowamori, Y. Toyofuku et al.] // *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* – 2006. – Vol. 26. – P. 2275-2280.
17. Bogachev V. Yu., Golovanova O. V., Kuznetsov A. N., Shekoyan A. O. Can Micronized Purified Flavonoid Fraction (MPFF) improve outcomes of lower extremity varicose vein endovenous treatment? // *First results from the DECISION study. Phlebology*. – 2013. – № 20 (4). – P. 181-187.
18. Cox F. L. Heart rate-corrected QT interval is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in individuals with type 2 diabetes: the Diabetes Heart Study / [F. J. Cox, A. Azeem, J. Veboah et al.] // *Diabetes care.* – 2014. – № 37 (5). – P. 1454-1461.
19. Kohl T. Diabetic liver injury from streptozotocin is regulated through the caspase-8 homolog cFLIP involving activation of JNK2 and intrahepatic immunocompetent cells / T. Kohl, N. Gehrke, A. Schad // *Cell Death and Dis.* – 2013. – doi:10.1038/cddis.2013.228.
20. Lars Ryben ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD / [Lars Ryben, Peter J. Grant, Stefan D. Anker et al.] // *European Heart J.* – 2013. – № 34. – P. 3035-3087.
21. *New concepts in diabetes and its treatment.* – Ed. by F. Belfore, C. Mogensen. – Karger AG, 2000.
22. *Vascular disease in diabetes. A report of hemovascular disease study group* / Ed. by J. Tooke. – Servier, France, 2001.
23. *Vascular endothelium. Physiology, pathology and therapeutic opportunities* / Ed. by G. Born, C. Schwartz. – Schattauer Stuttgart-New York. – Germany. – 1997.

УДК 615.25.252.349.7:615.451.16:582.894.6**В. А. Рыбак, Л. Н. Малоштан****ВЛИЯНИЕ БИОФЛАВОНОИДНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ФАСОЛИ НА СОСТОЯНИЕ КОАГУЛЯЦИОННОГО ГЕМОСТАЗА У ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ И У ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ**

На основании проведенных исследований выявлено, что использование биофлавоноидного комплекса из фасоли и кверцетина у интактных животных не способствовало достоверному влиянию на показатели коагуляционного гемостаза. У животных с экспериментальным стрептозотоциновым диабетом биофлавоноидный комплекс из фасоли и кверцетина нормализовали реологические свойства крови. Использование в лечении СД 2-го типа биофлавоноидного комплекса из фасоли даст возможность предупредить нарушения равновесия протромботических и фибринолитических свойств крови.

Ключевые слова: стрептозотоциновый диабет; коагуляционный гемостаз; кверцетин; биофлавоноидный комплекс из фасоли

UDC 615.25.252.349.7:615.451.16:582.894.6**V. A. Rybak, L. M. Maloshtan****THE EFFECT OF BIOFLAVONOID COMPLEX OF BEAN ON THE COAGULATIVE HEMOSTASIS IN INTACT RATS AND IN RATS WITH EXPERIMENTAL STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES**

On the basis of the conducted studies it has been found that use of the bio-flavonoid complex made of beans and quercetin in intact rats has not contributed to the likely impact on the indices of coagulation hemostasis. For the animals with experimental streptozotocin-induced diabetes the bioflavonoid complex made of beans and quercetin has been normalized with the help of blood rheology. The use of the bioflavonoid complex made of beans will allow to prevent imbalance prothrombotic and fibrinolytic properties of blood in the treatment of diabetes type 2.

Key words: streptozotocin-induced diabetes; coagulation hemostasis; quercetin; bioflavonoid complex made of beans

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.
Тел. (057) 706-23-42. E-mail: vitarybak@mail.ru.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції
12.06.2015 р.