

ДОСЛІДЖЕННЯ ГІПОЛІПІДЕМІЧНОЇ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ЛИСТЯ КАШТАНУ КІНСЬКОГО

І.Г.Пересадько, А.Л.Загайко, Н.П.Половко

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: *листя каштану кінського; гіполіпідемічна дія; антиоксидантна дія; атеросклероз*

Важливою проблемою при корекції метаболічних порушень організму в умовах стресу є пошук субстанцій, яким притаманні гіполіпідемічна та антиоксидантна властивості. Більшість синтезованих речовин здатні самі активувати вільнорадикальні процеси, тому привертають увагу насамперед субстанції природного, зокрема рослинного походження. Досліджені деякі показники метаболізму ліпідів і ліпопротеїнів, а також певні показники антиоксидантно-прооксидантного статусу сироватки крові і печінки щурів за умов емоційно-больового стресу та вплив профілактичного введення листя каштану кінського на ці показники. Введення подрібненого листя каштану кінського сприяє запобіганню несприятливих змін метаболізму ліпідів і розвитку оксидативного стресу в умовах емоційно-больового стресу. Була виявлена гіполіпідемічна та антиоксидантна активність подрібненого листя каштану кінського. Результати досліджень дозволяють рекомендувати листя каштану кінського для розробки перорального засобу для лікування та профілактики атеросклерозу.

Психоемоційні перевантаження, погіршення екологічного стану навколишнього середовища, незбалансоване харчування та інші несприятливі фактори, що діють на організм людини, можуть спричинити розвиток численних патологій, серед яких найбільшу увагу привертає атеросклероз [4, 7]. Згідно з даними літератури близько половини людей, які мешкають у цивілізованих країнах помирають, від ускладнень атеросклеротичного процесу в судинах різних органів [4]. Встановлено, що за умов стресу спостерігається накопичення в крові вмісту ліпопротеїнів, зокрема апо-В-вмісних ліпопротеїнів (Апо-В-ЛП), що є фактором ризику розвитку атеросклерозу. Підвищення в крові рівня Апо-В-ЛП призводить до підвищення адгезії циркулюючих моноцитів в ендотеліальними клітинами артерій [4, 10]. Посилене надходження Апо-В-ЛП до інтими, у свою чергу,

спричиняє накопичення ліпідів в інтими. Внаслідок складних структурних змін в інтими та медії артерій, що починаються з накопичення ліпідів, особливо холестеролу, у формі позаклітинних ліпідних частинок і масивних відкладень естерифікованого холестеролу у складі пінистих клітин і розвивається атеросклероз. Це призводить до закупорки судин та ішемічного ураження органів і тканин [4]. Ще одним фактором атерогенезу в умовах стресу є активація процесів вільнорадикального окиснення, що веде до окисного пошкодження ліпопротеїнових частинок [10]. Існує велика кількість даних щодо значної ролі окисно-модифікованих Апо-В-ЛП у процесах атерогенезу [8, 10, 11]. Окиснені Апо-В-ЛП мають виражені аутоімунні властивості, через що здатні відкладатися на стінках судин у вигляді комплексів з імуноглобулінами. Крім того, окисно-модифіковані Апо-В-

ЛП відіграють значну роль в утворенні пінистих клітин при атеросклерозі [4, 10, 11].

З огляду на сказане вище стає зрозумілим, що важливою проблемою при корекції метаболічних порушень організму в умовах стресу є пошук субстанцій, яким притаманні гіполіпідемічні та антиоксидантні властивості. Більшість синтезованих речовин здатна сама активувати вільнорадикальні процеси, тому привертають увагу насамперед субстанції природного, зокрема рослинного походження.

Метою даної роботи було вивчення гіполіпідемічної та антиоксидантної активності листя каштану кінського в нормі та за умов емоційно-больового стресу.

Матеріали та методи

В роботі використовували безпородних щурів-самиць вагою 180-200 г, які утримувались у виварії Національного фармацевтичного університету. Тварини отримували подрібнене листя каштану кінського per os щоденно протягом трьох тижнів з розрахунку 7 мг

Таблиця 1

Вплив листя каштану кінського на вміст окремих фракцій ліпідів та ліпопротеїнів у сироватці крові та гомогенаті печінки щурів (M±m, n=24)

Параметр	Інтакт	Каштан	Контроль (стрес)	Стрес+каштан
Сироватка крові				
Загальні ліпіди, мг/100 мл	325,00±16,09	299,00±31,08	412,00±23,67*	3056,00±33,65**
Триацилгліцериди, мг/100 мл	33,16±2,98	25,22±2,07*	56,94±2,34*	45,01±2,99*/**
Апо-В-ліпопротеїни, мг/мл	1,33±0,26	0,84±0,16*	4,19±0,38*	1,73±0,16**
Холестерин, мг/мл	86,90±7,02	63,20±6,12*	115,00±4,17*	91,12±7,98
Гомогенат печінки				
Загальні ліпіди, г/100 г	14,25±0,75	10,03±0,72	18,32±2,01*	14,56±1,91**
Апо-В-ліпопротеїни, мг/мл	4,95±0,56	6,04±0,54	7,68±0,47*	6,16±0,39*/**

Примітки:

1) * — $p < 0,05$ відносно інтакту;2) ** — $p < 0,05$ відносно контрольної групи.

на 100 г маси тіла у вигляді водної суспензії. Обрана доза відповідає 1,2 г даних об'єктів для людини вагою 70 кг. Контрольний групі тварин вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину. Пероральний спосіб введення був зумовлений тим, що використана субстанція — подрібнене листя не підлягала екстрагуванню і тому не була придатною для парентерального введення. Емоційно-больовий стрес відтворювали як описано в роботі [7, 15]. Тварин іммобілізували на животі протягом 3-х год. Потім їх декапітували під хлоралозо-уретановим наркозом через 3 год після іммобілізації. Печінку перфузували охолодженим фізіологічним розчином *in situ*. Кров збирали у центрифужні пробірки для отримання сироватки.

Фракції ЛВГ (ліпопротеїнів високої густини) та Апо-В-ЛП розділяли центрифугуванням сироватки крові та цитозолу печінки, до яких попередньо додавали розчини гепарину та CaCl_2 у присутності ЕДТА. Вимірювали оптичну густину гептан-ізопропанольних екстрактів вказаних фракцій при довжині хвилі 220 нм (для ізольованих подвійних зв'язків, ІПЗ), 232 нм (для дієнових кон'югатів, ДК) [2]. Вміст загальних гідроперекисів (ЗГП) вимірювали за реакцією з тіоціанатом амонію [6]. Вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали за допомогою реакції з тіобарбітуровою кислотою [9, 14].

Визначення кількості α -токоферолу проводили за кольоровою реакцією з двовалентним залізом; до результатів визначення вносили поправку на присутність холестеролу [3]. Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали в печінці спектрофотометрично за поглинанням комплексу з алоксаном при 305 нм [5].

Вміст загальних ліпідів визначали за реакцією з ваніліновим реактивом [1], триацилгліцеролів — з фенілгідазином [12], холестеролу — за допомогою стандартного набору фірми "Boehringer Mannheim" (Німеччина) (холестеролоксидазний метод).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням Х-критерію Ван-дер-Вардена.

Результати та їх обговорення

Як видно з представлених даних (табл. 1), тритижневе введення щурам листя каштану приводило до зниження в сироватці крові рівня триацилгліцеролів, загального холестерину, а також рівня Апо-В-ЛП. При цьому вміст загальних ліпідів і Апо-В-ЛП у гомогенаті печінки не змінювався (табл. 1). Це свідчить про те, що зниження рівня ліпідів під дією листя каштану кінського відбувалося не за рахунок пригнічення біосинтетичної функції печінки, а, ймовірно, завдяки гальмуванню

окиснення ліпідів і, отже, зниження потреби в них. Крім того, відомо, що зміна співвідношення фракцій ліпопротеїнів у сироватці крові у бік зниження рівня атерогенних фракцій — Апо-В-ЛП може знижувати ризик розвитку атеросклерозу [4, 15]. У літературі наявні дані про здатність деяких субстанцій рослинного походження знижувати швидкість синтезу апопротеїну В у печінці, що може приводити до зниження секреції Апо-В-ЛП у кров'яне русло [11].

З огляду на дані літератури про накопичення ліпідів і ліпопротеїнів у сироватці крові в умовах стресу (яке є фактором ризику виникнення атеросклерозу та діабету) становило інтерес вивчення впливу профілактичного введення листя каштану кінського на вміст загальних ліпідів і ліпопротеїнів у сироватці крові і печінки щурів при стресі. Найважливішим показником розвитку стрес-реакції є переключення метаболізму і використання вуглеводів як основного джерела енергії на використання ліпідів. Тому закономірно, що емоційно-больовий стрес викликав істотне збільшення загального вмісту ліпідів у сироватці крові (табл. 1). Профілактичне застосування листя каштану кінського приводило до нормалізації рівня загальних ліпідів у сироватці крові при стресі, що є важливим позитивним фактором, оскільки не супроводжу-

Таблиця 2

Вплив листя каштану кінського на деякі показники антиоксидантно-прооксидантного статусу сироватки крові та гомогенату печінки щурів ($M \pm m$, $n=24$)

Параметр	Інтакт	Каштан	Контроль (стрес)	Стрес + каштан
Сироватка крові				
GSH, мкмоль/л	14,14±1,85	5,68±1,24	8,21±1,18*	5,07±0,31*/**
Аскорбінова кислота, ммоль/л	65,89±4,49	69,13±5,07	47,70±4,89*	60,83±1,82**
α-Токоферол, ммоль/л	12,95±0,96	12,64±1,49	2,30±0,23*	7,93±0,54*/**
ІПЗ, ΔЕ/мл	8,04±0,52	7,89±0,44	3,26±0,32*	4,68±0,21*
ДК, ммоль/л	12,37±1,38	15,49±2,47	34,21±2,82*	25,83±2,05*/**
ЗГП, ммоль/л	141,00±8,91	142,00±6,16	296,00±9,24*	235,00±6,42*/**
МДА, нмоль/л	0,71±0,02	0,77±0,05	1,22±0,13*	1,10±0,12*/**
Гомогенат печінки				
GSH, мкмоль/г	5,66±0,76	5,89±0,63	9,54±1,01*	5,50±0,57*/**
Аскорбінова кислота, ммоль/г	1,50±0,13	1,79±0,16	0,72±0,66*	1,09±0,95*/**
α-Токоферол, ммоль/г	34,07±2,02	33,24±2,60	14,18±0,33*	13,95±6,14*
ІПЗ, ΔЕ/мг	39,12±3,33	36,12±3,59	6,68±0,57*	8,15±2,78*/**
ДК, ммоль/г	12,22±1,24	10,47±1,12	19,34±1,42*	16,01±1,48*/**
ЗГП, ммоль/г	367,00±15,78	349,00±27,34	721,00±53,56*	553,00±34,15*/**

Примітки:

1) * — $p < 0,05$ відносно інтакту;

2) ** — $p < 0,05$ відносно контрольної групи.

ється зниженням рівня ліпідів у печінці, тобто відбувається не за рахунок пригнічення ліпогенезу.

Як відомо, головним джерелом енергії при стресі є триацилгліцероли (ТГ), рівень яких на ранніх етапах підвищується за рахунок викиду цих сполук з жирових депо, а на пізніх — за рахунок активації ліпогенезу. З цим узгоджується відзначене нами збільшення вмісту ТГ у сироватці крові і загальних ліпідів у гомогенаті печінки при стресі (табл. 1). Згідно з нашими даними профілактичне введення листя каштану частково послаблювало ці ефекти (табл. 1).

Важливим негативним наслідком стрес-реакції є атерогенні зміни в ліпідному і ліпопротеїдному спектрі сироватки крові, зокрема, збільшення рівня холестерину і Апо-В-ЛП у сироватці крові. Подібні зміни були відзначені нами після іммобілізації (табл. 1). Вивчене нами подрібнене листя каштану кінського вірогідно знижувало вміст холестерину та Апо-В-ЛП у сироватці крові тварин, що

були піддані емоційно-больовому стресу. Отримані дані дозволяють припустити, що досліджуваний препарат зменшує секрецію Апо-В-ЛП печінкою, про що свідчить відзначене нами зниження рівня ліпопротеїнів у цьому органі (табл. 1).

Як було відзначено раніше, значне нагромадження в сироватці крові окисно-модифікованих ліпопротеїнів підвищує ризик розвитку атеросклерозу [13, 16]. Останнє може бути наслідком як активації вільнорадикальних процесів під дією продуктів розпаду катехоламінів, так і зниження рівня антиоксидантів у ліпопротеїнах і клітинах печінки [4, 8, 10, 13]. Згідно з отриманими в нашій роботі даними емоційно-больовий стрес супроводжувався активацією процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) як у сироватці крові, так і у печінці. Так, у сироватці крові відзначене зниження вмісту ізолюваних подвійних зв'язків — субстратів ПОЛ і збільшення рівня проміжних і кінцевих продуктів ПОЛ — загальних

гідроперексидів і МДА (табл. 2). Подібні зміни відзначені також у печінці (табл. 2). Установлене також зниження рівня антиоксидантів — аскорбінової кислоти і α-токоферолу в сироватці крові і печінці щурів, що піддавалися емоційно-больовому стресу (табл. 2). Введення листя каштану кінського не чинило впливу на показники антиоксидантно-прооксидантного статусу сироватки крові і печінки щурів у нормі (табл. 2). Це свідчить про те, що така субстанція не є стресуючою та добре переноситься тваринами. При цьому попереднє введення за умов емоційно-больового стресу частково нормалізувало рівень субстратів і продуктів ПОЛ як у сироватці крові, так і в печінці щурів (табл. 2). Введення листя каштану кінського частково запобігало збільшенню рівня відновленого глутатіону в сироватці крові і у печінці (табл. 2). При цьому його введення не запобігало падінню рівня аскорбінової кислоти і α-токоферолу у сироватці крові і у печінці щурів при емоційно-больо-

вому стресі (табл. 2). Ці дані дозволяють припустити, що здатність листя каштану кінського блокувати процеси ПОЛ пов'язана з наявністю в них антиоксидантів, відмінних від наявних в організмі.

ВИСНОВКИ

1. При проведенні фармакологічних досліджень подрібненого листя каштану кінського було виявлені гіполіпідемічну та антиоксидантну активність.

2. Результати досліджень дозволяють рекомендувати листя каштану кінського для розробки перорального засобу для лікування та профілактики атеросклерозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Биологические мембраны. Методы. / Под ред. Дж.Финдлея, У.Эванса. — М.: Мир, 1990. — 424 с.
2. Волчегорский И.Ф., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. // *Вопр. мед. химии.* — 1989. — №1. — С. 127-131.
3. Кибардин С.А. // *Биохимия.* — 1951. — Т. 16. — С. 511-514.
4. Климов А.Н., Никульчева Н.Г. *Липиды, липопротеиды и атеросклероз.* — С.-Пб: Питер пресс, 1995. — 304 с.
5. Пүтилина Ф.Е. *Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях // Методы биохим. иссл. под ред. Прохоровой М.И.* — М., 1982. — С. 183-185.
6. Романова Л.А., Стальная И.Д. *Метод определения гидроперекисей липидов с помощью тиоцианата аммония // Современные методы в биохимии / Под ред. Ореховича В.Н.* — М.: Медицина, 1977. — С. 64-66.
7. Соколова Е.Д., Березин Ф.Б., Барлас Т.В. // *Materia Medica.* — 1996. — Т. 9, №1. — С. 5-56.
8. Dutta A., BSc and Sudhir K., Dutta M. // *J. of the Am. Coll. of Nutr.* — 2003. — Vol. 22, №4. — P. 258-268.
9. Hinara M., Chigama M., Fukuzanava K. // *Biochem. Med.* — 1980. — Vol. 23. — P. 302-311.
10. Neuzil J., Julie K., Christison J. et al. // *The J. of Lipid Res.* — 1998. — Vol. 3. — P. 354-368.
11. Pal S. // *J. Nutr.* — 2003. — Vol. 133. — P. 700-706.
12. Tixer M., Claude J. // *Ann. Biol. Clin. Ales.* — 1974. — Vol. 32. — P. 53-57.
13. Tian L., Lei Q., Wei H. // *Free Radic. Biol. Med.* — 1998. — Vol. 27, №9. — P. 1477-1484.
14. Ushiyame M., Mihere M. // *Anal. Biochem.* — 1978. — Vol. 86. — P. 271-278.
15. Violento V.P. // *S. Gerontol.* — 1985. — Vol. 18. — P. 48-51.
16. Yu B.P. // *Physiol. Rev.* — 1994. — Vol. 74, №1. — P. 139-162.

Адреса для листування: 61146, м. Харків,
вул. Блюхера, 4. Тел. (0572) 67-87-75.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 23.11.2004 р.