

УДК 615.322:612.015.32

ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ФЛАВОНОИДОВ НА АССИМИЛЯЦИЮ УГЛЕВОДОВ У КРЫС

¹Кучкарова Л.С., ¹Каюмов Х.Ю., ²Эргашев Н.А., ³Эшбакова К.А.

¹Национальный университет Узбекистана, Ташкент, e-mail: qayumovhasan@mail.ru;

²Институт биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана, Ташкент,
e-mail: nurali7973@mail.ru;

³Институт химии растительных веществ Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент,
e-mail: e_komila@yahoo.com

Острый панкреатит на сегодня является прогрессивно распространяющимся заболеванием, для которого профилактические и корригирующие препараты ещё не разработаны. Цель исследования – изучить профилактическое влияние некоторых флавоноидов на ассимиляцию углеводов при остром панкреатите. Острый панкреатит вызывали двумя внутривенными инъекциями крысам L-аргинина (100 мг/кг) с промежутком в 2 часа. Оказалось, что у крыс с вызванным острым панкреатитом имело место увеличение активности α -амилазы и содержания глюкозы в сыворотке крови наряду с уменьшением активности α -амилазы в кишечном содержимом, активности мальтазы в слизистой оболочке тонкой кишки, а также содержания гликогена в печени. Двукратное введение рутина, дигидрокверцетина, пуликарона и тамифлазида в дозе 50 мг/кг/24 ч за 2 дня до индукции острого панкреатита предупреждало вызванные панкреатитом сдвиги в ассимиляции углеводов в полости тонкой кишки и уровня глюкозы и активности α -амилазы в крови. Профилактический эффект в развитии панкреатита рутина и дигидрокверцетина проявлялся больше, чем для пуликарона и тамифлазида. Следовательно, введение флавоноидов способствует предупреждению развития панкреатита, а также сопутствующих негативных сдвигов в полостном и мембранном гидролизе и метаболизме углеводов.

Ключевые слова: L-аргининовый панкреатит, флавоноиды, глюкоза крови, α -амилаза крови и химуса, энтеральная мальтаза, гликоген печени

PREVENTIVE EFFECT OF SOME FLAVONOIDS ON THE ASSIMILATION OF CARBOHYDRATES IN RATS

¹Kuchkarova L.S., ¹Kayumov Kh.Yu., ²Ergashev N.A., ³Eshbakova K.A.

¹National University of Uzbekistan, Tashkent, e-mail: qayumovhasan@mail.ru;

²Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan, Tashkent,
e-mail: nurali7973@mail.ru;

³Institute of Chemistry of Plant Substances of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Tashkent, e-mail: e_komila@yahoo.com

Acute pancreatitis today is a progressively spreading disease, for which preventive and corrective preparations have not yet been developed. The purpose of the research is to study the preventive effect of certain flavonoids on the assimilation of carbohydrates in acute pancreatitis. Acute pancreatitis was induced by two intraperitoneal injections of L-arginine (100 mg/kg) to rats with an interval of two hours. It turned out that in rats with induced acute pancreatitis, there was an increase in the serum α -amylase activity and glucose level, along with a decrease in α -amylase activity in the intestinal contents, maltase activity in the small intestine mucosa, and glycogen content in the liver. Double administration of rutin, dihydroquercetin, pulicaron, and tamiflazid at a dose of 50 mg/kg/24 h two days before the induction of acute pancreatitis prevented pancreatitis-induced shifts in carbohydrate assimilation in the small intestine cavity and blood glucose level and α -amylase activity. The preventive effect in the development of pancreatitis for rutin and dihydroquercetin was more pronounced than for pulicaron and tamiflazid. Therefore, the introduction of flavonoids helps to prevent the development of pancreatitis, as well as concomitant negative changes in cavity and membrane hydrolysis and carbohydrate metabolism.

Keywords: L-arginine pancreatitis, flavonoids, blood glucose, α -amylase of blood and chyme, enteral maltase, liver glycogen

Острый панкреатит – это наиболее широко распространенное заболевание органов пищеварения, риск подверженности которому по всему миру прогрессивно увеличивается. [1, 2]. Несмотря на то, что недавно были выявлены некоторые основы патогенеза острого панкреатита, специфических средств профилактики и лечения этого заболевания пока не существует [3, 4]. Было описано, что триггером патогенеза острого

панкреатита, вызванного перевязкой панкреатического протока, введением церулина или аминокислот, является оксидативный стресс, который вызывает увеличение таких опасных метаболитов, как активные формы кислорода и азота. Параллельно в ткани поджелудочной железы и сыворотке крови возрастают активности антиоксидантных и панкреатических гидролитических ферментов [5, 6]. Метаболиты оксидативного

стресса вызывают деполяризацию и модификацию мембран и белков, перекисное окисление липидов, фрагментацию ДНК в клетках органа, приводя к некрозу ацинусов поджелудочной железы [6]. Они также служат в качестве сигналов, вовлекающих нитрогенактивируемые протеинкиназы и другие факторы воспалительного каскада при остром панкреатите [5, 6].

На сегодняшний день диета остается одним из важных моментов как в профилактике, так и в лечении заболевания. Она должна содержать необходимое количество основных нутриентов (белков, жиров и углеводов) при обязательном дробном питании и достаточное количество биологически активных веществ. Среди растительных биологически активных соединений многие флавоноиды привлекают внимание исследователей в качестве веществ, оказывающих корректирующее влияние на воспалительные процессы в поджелудочной железе и других органах пищеварения [7]. На этом основании было предположено, что растительные флавоноиды смогут оказать не только корректирующее, но и профилактическое влияние, т.е. облегчить развитие острого панкреатита и связанного с ним гидролиза углеводов в тонкой кишке. Этот вопрос требует исследования и поэтому, что большинство флавоноидов, поступающая в полость тонкой кишки с пищей, непосредственно контактируют с ферментами в полости тонкой кишки и ферментами, встроенными в апикальную мембрану энтероцитов, а влияние их на мембранный гидролиз нутриентов, в том числе и гидролиз углеводов, практически не исследовано.

Цель работы – изучить профилактическое влияние некоторых флавоноидов на ассимиляцию углеводов при остром панкреатите.

Материалы и методы исследования

В опытах были использованы белые беспородные крысы-самцы массой 180–200 г. Крыс делили на одну контрольную и пять опытных групп, по 6 крыс в каждой. Контрольная и первая опытная группы крыс в течение двух дней с промежутком в 24 ч перорально получали физиологический раствор. У крыс второй опытной группы вызывали экспериментальный острый панкреатит двумя внутривентральными инъекциями L-аргинина (500 мг/100 г) с интервалом в два часа. Крысам третьей, четвертой, пятой и шестой опытных групп за 2 дня до индуцирования острого панкреатита перорально вводили рутин, растворенный в 1% растворе диметилсульфида, а также растворы дигидрокверцетина, пуликарона и тамифлазида в 0,9% NaCl в дозе 50 мг/кг

/сутки соответственно в те же сроки, таким же образом и в эквивалентном объеме.

Все используемые флавоноиды были получены в лаборатории терпеноидов и кумаринов Института химии растительных соединений Академии наук Республики Узбекистан. Рутин был получен из гречихи обыкновенной (*Fagopyrum esculentum* Moench), дигидрокверцетин – из черного берёзового гриба (*Inonotus obliquus*), пуликарон – из блошицы сушеницевидной (*Pulicaria gnaphalodes*), а тамифлазид – из василистника обыкновенного (*Thalictrum minus*).

Все процедуры выполнялись в соответствии с требованиями Женевской конвенции «International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals» (1990).

Кровь, полученную при декапитации крыс, на третий день после индукции острого панкреатита, собирали в парафиновые пробирки. Далее у крыс быстро вскрывали брюшную полость, извлекали поджелудочную железу, разрезали орган на кусочки, гомогенизировали тefлоновым пестиком при 3000 об/мин в течение минуты. Извлеченную тонкую кишку очищали от жировой ткани, промывали физиологическим раствором из расчета 1 мл на 10 см кишечника. Смыв кишечника применяли для определения активности α -амилазы кишечного химуса. Затем тонкую кишку просушивали фильтровальной бумагой и осторожно пластиковым шпателем соскабливали с неё слизистую. Слизистую взвешивали, заливали физиологическим раствором из расчета 9 мл на 1 г ткани и гомогенизировали тем же способом, что и поджелудочную железу.

Полученные пробы крови, смыв кишечника (разбавленный химус) и гомогенаты поджелудочной железы и слизистой оболочки тонкой кишки центрифугировали (5000 об/мин) в течение 15 мин. Супернатант крови переносили в этикированные пробирки и использовали для определения глюкозы, а также активности α -амилазы (КФ – 3.2.1.1). В супернатанте смыва тонкой кишки определяли активность α -амилазы, а в супернатантах поджелудочной железы и слизистой оболочки тонкой кишки была определена активность α -амилазы и мальтазы (КФ – 3.2.1.20) соответственно. Все операции проводили на холоде. Содержание глюкозы и активность α -амилазы определяли при помощи специального биохимического анализатора Rayto RT 1904C Semi Auto Chemistry Analyzer (Китай) с использованием стандартных реактивов. Активность мальтазы определяли глюкозооксидазным методом при помощи специального набора “Human” (Германия) содержание гликогена в печени – антроновым методом [8].

Полученные результаты были обработаны с применением t-критерия Стьюдента. Вычисляли среднюю арифметическую величину (M), среднюю ошибку средней ($\pm m$) и показатель достоверности (P). Различия между опытными и контрольными группами принимали за достоверные при вероятности более 95 % ($P < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Оказалось, что экспериментальный панкреатит приводил к повышению уровня α -амилазы в сыворотке крови в 3,7 раз. Пероральное введение флавоноидов вызывало снижение повышенного при панкреатите уровня активности фермента. После введения крысам рутина и затем L-аргинина активность α -амилазы оставалась на уровне контроля. Введение дигидрокверцетина до вызванного панкреатита также не вызывало повышения активности α -амилазы, которое имело место у крыс с панкреатитом без предварительной обработки флавоноидами. Профилактическое влияние пуликарона и тамифлазида на активность α -амилазы было слабо выраженным. Однако активность фермента была ниже величин, зарегистрированных у крыс, не получавших флавоноидов для профилактики вызванного L-аргинином панкреатита (рис. 1, А).

Приблизительно такая же тенденция была отмечена в изменении активности α -амилазы ткани поджелудочной железы. Активность фермента возрастала в 8,1 после индукции острого панкреатита. Однако если до экспериментального панкреатита крысам перорально вводили рутин, дигидрокверцетин, пуликарон и тамифлазид, то увеличение активности фермента было в 5,7; 1,6; 7,0 и 1,8 раза соответственно. т.е. введение биофлавоноидов предупреждало вызванное панкреатитом возрастание активности α -амилазы в ткани органа, хотя и не полностью (рис. 1, Б).

Несмотря на то, что при остром панкреатите активность α -амилазы в крови и ткани поджелудочной железы увеличивалась, в содержимом тонкой кишки, куда выделяется панкреатический сок, активность фермента была в 4,6 раз ниже по сравнению с контролем. Если до индукции острого панкреатита крысам перорально вводили рутин, дигидрокверцетин, пуликарон и тамифлазид активность фермента в полости тонкой кишки была ниже в 2,5; 1,2; 2,9 и 2,0 раза соответственно, чем в контроле. Профилактическое влияние рутина и дигидрокверцетина на активность α -амилазы содержимого тонкой кишки было наиболее выраженным (рис. 2, А).

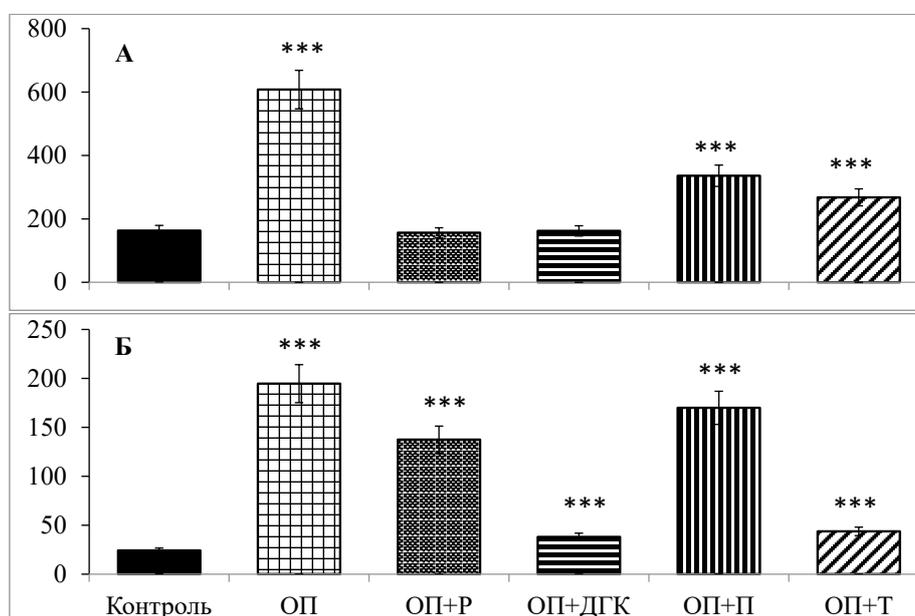


Рис. 1. Активность α -амилазы крови (ед/л) и ткани поджелудочной железы (ед/г ткани) у крыс с L-аргининовым панкреатитом и крыс, получавших перорально до индукции панкреатита флавоноиды ($M \pm m$, при $n = 6$). Здесь и далее: ОП – крысы с вызванным острым панкреатитом; ОП+Р; ОП+ДГК; ОП+П; ОП+Т – крысы, которым перед индуцированием острого панкреатита соответственно вводили рутин, дигидрокверцетин, пуликарон и тамифлазид: * – $< 0,05$; ** – $0,01$; *** – $< 0,001$

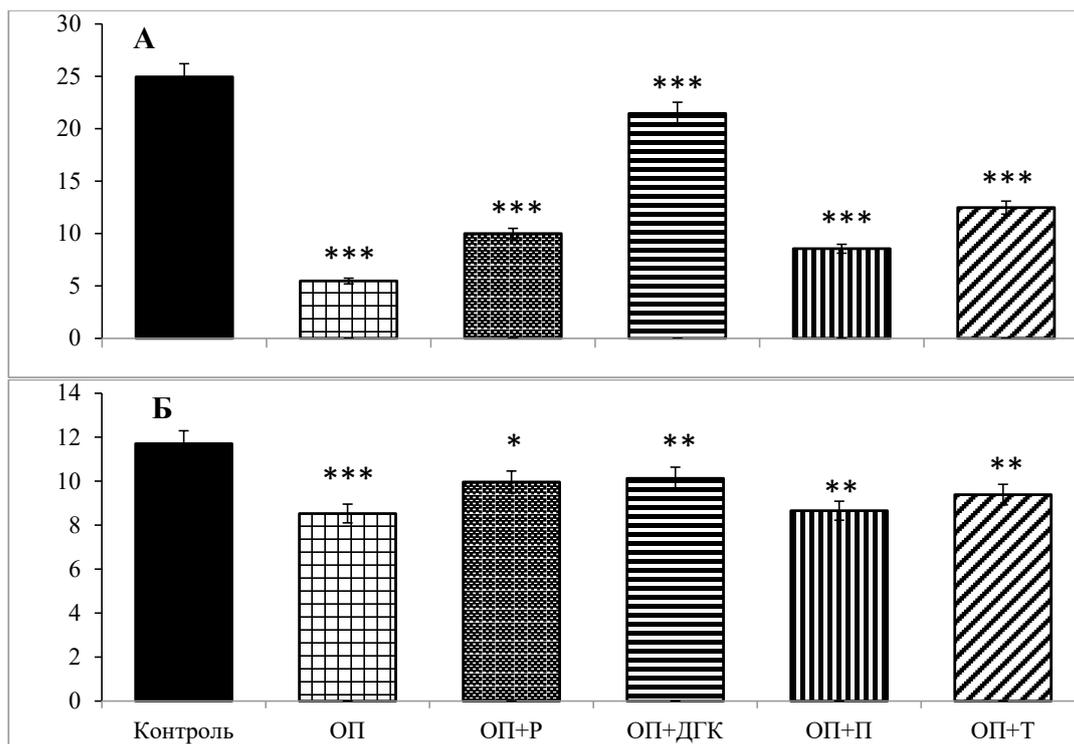


Рис. 2. Активность α -амилазы в содержимом кишечника (ед/л) (А) и мальтазы в слизистой оболочке кишки ($\mu\text{моль}/\text{мин}/\text{г}$ ткани) (Б) у крыс с острым панкреатитом и крыс, получавших перорально до индукции панкреатита флавоноиды ($M \pm m$, при $n = 6$)

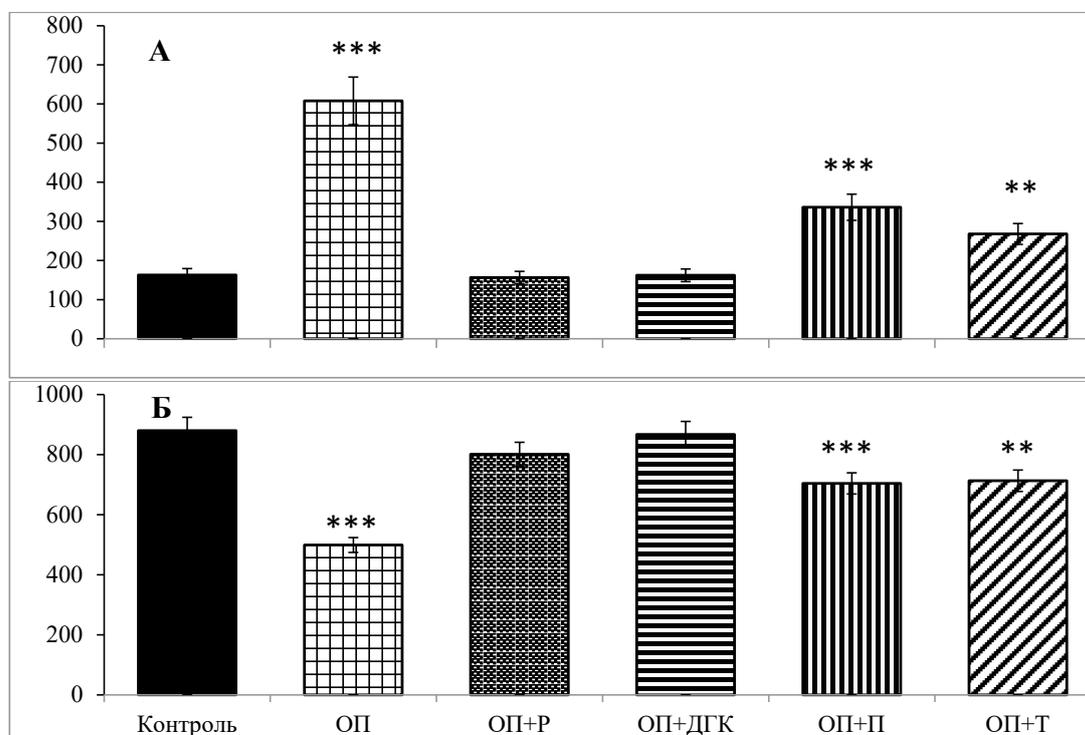


Рис. 3. Содержание глюкозы (ммоль/л) в крови (А) и гликогена в печени (мг/100 г массы) (Б) у крыс с острым панкреатитом и крыс, получавших перорально до индукции панкреатита флавоноиды ($M \pm m$, при $n = 6$)

Острый панкреатит вызывал также снижение активности энтеральной мальтазы. Активность фермента уменьшалась у крыс с острым панкреатитом на 37,4%. Если до получения L-аргинина крысам вводили рутин или пуликарон и тамифлазид, то уменьшение активности фермента сокращалось и составляло 19,8; 19,6 и 10,5% соответственно. Дигидрокверцетин приводил к полному сохранению специфической активности мальтазы в слизистой оболочке тонкой кишки, несмотря на вызванный позже экспериментальный панкреатит (рис. 2, Б).

Ацинарные клетки поджелудочной железы способны к более быстрому синтезу и накоплению белка по сравнению с другими клетками органа [2]. Однако, когда содержание аминокислот, например L-аргинина, превышает допустимые нормы, структура и функция ацинусов поджелудочной железы нарушаются, приводя к выделению из лизосом ферментов и активации панкреатических зимогенов, являющихся причиной аутофагии органа. Такие патологические сдвиги вызывают на начальных стадиях заболевания неинфекционное, а затем и инфекционное воспаление тканей органа [9–11]. Кроме того, выявлено, что L-аргинин индуцирует экспрессию гена белка, ассоциированного с панкреатитом, а также апоптоз в ацинарных клетках поджелудочной железы [10]. Образование свободных радикалов и перекисное окисление липидов, способствующих разрушению мембран клеток и клеточных органелл, также играет существенную роль в патогенезе воспаления, фиброза и апоптоза ткани [5, 6].

Выявленное увеличение активности панкреатической α -амилазы в гемоциркуляции и ткани поджелудочной железы и уровня глюкозы в сыворотке крови имеет место одновременно с возрастанием активности и других, в частности протеолитических ферментов в поджелудочной железе и сыворотке крови, которые являются индикаторами аутофагии с сопутствующей деструкцией ацинусов поджелудочной железы [6]. Возрастание активности панкреатических ферментов в сыворотке крови обычно имеет место на фоне повышенной активности панкреатической миелопероксидазы, повышенного содержания фактора некроза опухоли- α , интерлейкина-6, а также снижения уровня интерлейкина-10 в сыворотке [10, 11]. Выявленное у крыс с L-аргининовым панкреатитом уменьшение активности α -амилазы в содержимом кишечника, скорее всего, обусловлено уменьшением секреции сока поджелудочной железы в двенадцатиперстную

кишку и связано с непроходимостью микро- и макропротоков органа из-за гистофункциональных сдвигов в ацинусах, препятствующих оттоку панкреатического сока в полость тонкой кишки. В результате имеет место снижение интенсивности начальных стадий гидролиза углеводов, в частности крахмала, в полости тонкой кишки, в котором определяющую роль играет α -амилаза поджелудочной железы. В снижении способности ассимилировать углеводы в тонкой кишке при остром панкреатите вносит лепту и отмеченное в экспериментах уменьшение активности мальтазы слизистой оболочки тонкой кишки. Уменьшение полостного (активность α -амилазы химуса) и мембранного (активность мальтазы слизистой кишки) гидролиза углеводов в тонкой кишке при остром панкреатите, естественно, сокращает поступление глюкозы из полости кишечника в гемоциркуляцию. В этом случае существенной причиной гипергликемии, как показывают результаты, является распад полисахаридов тканей, в первую очередь гликогена печени, содержание которого в органе уменьшилось при остром L-аргининовом панкреатите в 1,8 раз (рис. 3, Б).

Используемые в настоящем исследовании флавоноиды: рутин, дигидрокверцетин, пуликарон и тамифлазид в той или иной степени оказывали профилактическое влияние на биохимические показатели крови, поджелудочной железы и слизистой оболочки тонкой кишки, отражающие степень выраженности острого панкреатита. Профилактическое влияние биофлавоноидов проявлялось, прежде всего, в уменьшении активности панкреатической α -амилазы в ткани поджелудочной железы и крови, а также в уменьшении содержания глюкозы в крови – маркеров панкреатита и предикторов тяжести заболевания [11, 12].

Большинство флавоноидов обладают выраженными антиоксидантными свойствами, с чем в значительной степени и связаны их потенциальные мембранотропные эффекты, в том числе и для мембран ацинарных клеток и их органоидов [7, 13]. Скорее всего, профилактирующее влияние флавоноидов определяется взаимодействием препаратов с клеточными мембранами, в конечном итоге способствующим сохранению фазового состояния липидов мембраны, а также структурной и функциональной организации ацинарных клеток поджелудочной железы при остром панкреатите. Заметное выраженное профилактическое влияние рутина и дигидрокверцетина предполагает использование их в качестве препаратов для предупреждения и коррекции острого панкреатита.

Список литературы

1. Peery A.F., Crockett S.D., Barritt A.S., Dellon E.S., Eluri S., Gangarosa L.M., Jensen E.T., Lund J.L., Pasricha S., Runge T., Schmidt M., Shaheen N.J., Sandler R.S. Burden of gastrointestinal, liver, and pancreatic diseases in the United States. *Gastroenterology*. 2015. Vol. 7. P. 1731–1741.
2. Xiao A.Y., Tan M.L., Wu L.M., Asrani V.M., Windsor J.A., Yadav D., Petrov M.S. Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies. *Lancet Gastroenterology and Hepatology*. 2016. Vol. 1. No. 1. P. 45–55.
3. van Dijk S.M., Hallensleben N.D.L., van Santvoort H.C., Fockens P., van Goor H., Bruno M.J., Besselink M.G. Acute pancreatitis: recent advances through randomized trials. *Gut*. 2017. Vol. 66. No. 11. P. 2024–2032.
4. Moggia E., Koti R., Belgaumkar A.P., Fazio F., Pereira S.P., Davidson B.R., Gurusamy K.S. Pharmacological interventions for acute pancreatitis. *Cochrane Database Systematic Reviews*. 2017. Vol. 21. No. 4. DOI: 10.1002/14651858.CD011384.pub2.
5. Robles L., Vaziri N.D., Ichii H. Role of oxidative stress in the pathogenesis of pancreatitis: effect of antioxidant therapy. *Pancreat Disorders and Therapy*. 2013. Vol. 3. No. 1. DOI: 10.1002/14651858.CD011384.pub2.
6. Manohar M., Verma A.K., Venkateshaiah S.U., Sanders N.L., Mishra A. Pathogenic mechanisms of pancreatitis. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2017. Vol. 8. No. 1. P. 10–25. DOI: 10.4292/wjgpt.v8.i1.10.
7. Shapiro H., Singer P., Halpern Z., Bruck R. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. *Gut*. 2007. Vol. 56. P. 426–435.
8. Алексахина Н.В., Мешкова Н.П. Практическое руководство к занятиям по биохимии животных. Углеводы. М.: МГУ, 1967. 46 с.
9. Logsdon C.D., Ji B. The role of protein synthesis and digestive enzymes in acinar cell injury. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 2013. Vol. 10. No. 6. P. 362–370.
10. Wang N., Zhang F., Yang L., Zou J., Wang H., Liu K., Liu M., Zhang H., Xiao X., Wang K. Resveratrol protects against L-arginine-induced acute necrotizing pancreatitis in mice by enhancing SIRT1-mediated deacetylation of p53 and heat shock factor. *International Journal of Molecular Medicine* 2017. Vol. 40. Iss. 2. P. 427–437.
11. Yang X., Zhang R., Jin T., Zhu P., Yao L., Li L., Cai W., Mukherjee R., Du D., Fu X., Xue J., Martina R., Liu T., Pendharkar S., Phillips A.R., Singh V.K., Sutton R., Windsor J.A., Deng L., Xia Q., Huang W. Stress hyperglycemia is independently associated with persistent organ failure in acute pancreatitis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2022. Vol. 67. No. 5. P. 1879–1889.
12. Phillip V., Steiner J.M., Algül H. Early phase of acute pancreatitis: Assessment and management. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2014. Vol. 5. No. 3. P. 158–168.
13. Sidra A.S., Badshah M.S.L., Khan N., Lubna Ghani L., Poulson B.G., Emwas A.-H., Jaremko M. *Molecules*. 2020. Vol. 25. No. 22. 5243. DOI: 10.3390/molecules25225243.