

Н.О. Бабенко, О.Г. Шахова

Вікові особливості впливу флавоноїдів на зовнішньосекреторну функцію печінки щурів

Изучали действие растительных флавоноидов, выделенных из Chamomilla recutita (L) (камилофлан), на секрецию холестерина и желчных кислот из печени половозрелых и старых белых крыс. Установлено, что камилофлан оказывает дозозависимое стимулирующее влияние на холерез, усиливает билиарную экскрецию желчных кислот у крыс обеих возрастных групп и не влияет на содержание холестерина в печени и его выведение с желчью у половозрелых крыс. Наряду с этим, в печени старых животных он снижает повышенное с возрастом содержание холестерина до уровня молодых крыс и усиливает его билиарную экскрецию.

ВСТУП

Флавоноїди – компоненти рослинної їжі, які регулярно надходять до організму людини у складі овочів, фруктів, чаю і виявляють фізіологічний вплив на різні органи та системи. Встановлено мембраностабілізуючу (Р-вітамінна), діуретичну, антитоксичну, антимутагенну та жовчогінну дії флавоноїдів [18]. Їм властивий гіполіпідемічний вплив на здорових тварин і на тварин, яких утримують на дієтах, збагачених холестерином [20, 23]. Відомо, що в процесі постнатального онтогенезу відбуваються істотні зміни обміну холестерину і жовчних кислот в організмі людини, однак дані літератури з цього питання досить суперечливі. Є відомості щодо зниження екскреторної функції печінки людини з віком [2]. В експериментах на щурах та ізольованій печінці, що перфузується, показано зниження біліарної екскреції холестерину і жовчних кислот, зниження синтезу жовчних кислот і зміна їхнього складу в жовчі з віком [15, 21]. Інші автори [22] відмічають відсутність вікових змін рівня синтезу, екскреції і обміну жовчних кислот і підвищення біліарної екскреції холестерину у старих щурів. Суперечливість цих даних

багато в чому пов'язана з використанням в експериментах тварин різних ліній і віку. Зважаючи на те, що флавоноїдам властивий істотний регулювальний вплив на ключові ферменти обміну стеролів у організмі тварин і людини [20, 23], у цій роботі вивчали дію рослинних флавоноїдів на секрецію холестерину і жовчних кислот печінкою щурів різного віку.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 111 статевозрілих (3 міс) і старих (24 міс) білих щурах-самцях. Наркотизованим тваринам (нембутал, 50 мг/кг) розкривали черевну порожнину й у загальну жовчну протоку вставляли поліетиленову канюлю діаметром 1мм, яку виводили у пробірку. У роботі використовували флавоноїди (камілофлан), виділені з *Chamomilla recutita* (L) у Державному науковому центрі лікарських засобів м. Харкова. Камілофлан містить флавоноли – апігенін і лютеолін, флавоноли – ізорамнетин і кверцетин тощо. Спиртовий розчин камілофлану вводили щурам дослідних груп інтрадуаденально в дозах 20, 40, і 80 мг/кг після реєстрації фонові секретії жовчі протягом 1 год. Контрольним тваринам

вводили еквівалентний об'єм розчинника. Жовч збирали протягом 4 год, вимірюючи щогодини її об'єм. У фоновій порції жовчі й у період максимального посилення жовчовиділення під дією камілофлану (2-га година) визначали концентрацію холестерину та загальний вміст жовчних кислот [5]. У гомогенаті печінки щурів, які одержували камілофлан у дозі 160 мг/кг внутрішньошлунково протягом 6 діб, визначали вміст холестерину. Екстракцію ліпідів із гомогенату печінки проводили за методом Блайя і Дайера [7], виділення холестерину — методом тонкошарової хроматографії в системах розчинників — гексан: діетиловий ефір: льодяна оцтова кислота (73:25:2, за об'ємом). Визначення вмісту холестерину в хроматографічних фракціях проводили за методом Марча і Вейнстейна [17], вміст загального білка в гомогенаті печінки — за методом Лоурі [16]. Експериментальні результати наведено як середнє арифметичне \pm стандартна похибка середнього, для порівняння використовували однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA, Fisher LSD – test) і критерій t Стьюдента. Розходження між групами вважали статистично вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У нашому дослідженні було встановлено, що швидкість потоку жовчі щурів статистично вірогідно не змінюється з віком. Швидкість фонові секретії жовчі статевозрілих щурів становила $0,73$ мл/год $\pm 0,031$ мл/год, а старих — $0,83$ мл/год $\pm 0,042$ мл/год. Разом з тим у 24-місячних тварин порівняно з 3-місячними спостерігалось вірогідне зниження біліарної екскреції жовчних кислот і холестерину. Так, концентрація жовчних кислот у жовчі статевозрілих тварин була $1159,3$ мг% $\pm 56,18$ мг%, у той час як у старих — $791,9$ мг% $\pm 46,42$ мг% ($t(62) = 5,04$, $P < 0,001$), а вміст холестерину

в жовчі — $36,0 \pm 2,78$ і $18,1$ мг% $\pm 1,3$ мг% ($t_{(57)} = 5,84$, $P < 0,001$) у 3- і 24-місячних щурів відповідно. Згідно з сучасними уявленнями секретія жовчі гепатоцитами зумовлена трансгепатоцелюлярним надходженням H_2O із крові в жовчні каналікули за осмотичним градієнтом, що створений внаслідок активного транспорту органічних речовин: жовчних кислот, глутатіону HCO_3^- і неорганічних іонів [6]. Процеси трансмембранного транспорту багато в чому залежать від складу мембран. Показано зміни жирнокислотного складу каналікулярних мембран гепатоцитів старих щурів порівняно з молодими [13]. Зміна складу жирних кислот, а також вікове підвищення вмісту холестерину у мембранах призводять до зниження плинності клітинних мембран у старих щурів. В експериментах на гомогенаті печінки щурів встановлено вікову зміну активності Na^+, K^+ -АТФази, що бере участь у енергозалежному транспорті жовчних кислот через синусоїдальну мембрану. Зміна складу і властивостей мембран гепатоцитів з віком спричинює порушення їх транспортної здатності. Так, у старому віці знижується транспорт жовчних кислот, органічних аніонів і ксенобіотиків [14, 15].

Таким чином, отримані в нашій роботі результати щодо зниження секретії жовчних кислот і холестерину із жовчю старих щурів порівняно зі статевозрілими тваринами можуть свідчити про зниження екскреторної функції печінки з віком і збігаються з літературними даними [15, 21].

З метою вивчення вікових аспектів впливу флавоноїдів на холерез щурів було проведено три серії експериментів: у першій здійснювався скринінговий пошук ефективної дози камілофлану, у другій — вивчення складу жовчі тварин на фоні посилення холерезу, у третій — визначення вмісту холестерину в гомогенаті печінки щурів, що одержували камілофлан.

Установлено, що камілофлан чинить дозозалежний стимулювальний вплив на

процес жовчовиділення як у статевозрілих, так і у старих тварин; максимальний ефект спостерігався при дозі 80 мг/кг (рис. 1). У досліджених порціях жовчі статевозрілих і старих щурів, що одержували камілофлан, концентрація жовчних кислот не відрізнялася від контрольних значень (рис. 2). Водночас камілофлан у дозі 80 мг/кг підсилював загальне виведення жовчних кислот внаслідок збільшення об'єму жовчі, яка секретувалася. Так, у молодих контрольних тварин швидкість виведення жовчних кислот становила $2,24 \text{ мг/год} \pm 0,11 \text{ мг/год}$; введення флавоноїдів збільшувало це значення до $5,15 \text{ мг/год} \pm 0,248 \text{ мг/год}$ у дослідних тварин ($t_{(11)} = 10,73$, $P < 0,001$). У старих контрольних і дослідних щурів швидкість виведення жовчних кислот становила $3,55 \pm 0,61$ і $6,44 \text{ мг/год} \pm 1,49 \text{ мг/год}$ відповідно ($t_{(12)} = 2,25$, $P < 0,05$). Інакше камілофлан впливав на виведення холестерину із жовчю (див. рис. 2). У статевозрілих дослідних тварин спостерігалось зниження концентрації холестерину у аналізованій порції жовчі, однак загальне виведення холестерину не відрізнялося від контрольних значень. Водночас введення камілофлану (80 мг/кг) призводило до різкого підвищення концентрації холестерину в жовчі старих щурів, що супроводжувалося посиленням його виведення ще і внаслідок збільшення жовчовиділення. Так, загальний вміст виведеного з жовчю холестерину у 3-місячних дослідних щурів становив $0,106 \text{ мг/год} \pm 0,046 \text{ мг/год}$ (контроль – $0,111 \text{ мг/год} \pm 0,007 \text{ мг/год}$), а у 24-місячних – $0,362 \text{ мг/год} \pm 0,088 \text{ мг/год}$ (контроль – $0,083 \text{ мг/год} \pm 0,016 \text{ мг/год}$, $t_{(11)} = 3,12$, $P < 0,01$). Слід зазначити, що багаторазове введення камілофлану не впливає на вміст холестерину у гомогенаті печінки статевозрілих щурів: у контрольних тварин і у дослідних цей показник становив $12,16 \pm 1,57$ і $15,83 \text{ нмоль/мг білка} \pm 1,27 \text{ нмоль/мг білка}$ відповідно. Багаторазове введення камілофлану старим тваринам зни-

жувало підвищений з віком вміст холестерину до рівня молодих щурів.

Встановлені в роботі вікові особливості дії камілофлану на екскрецію холестерину пов'язані, ймовірно, зі зміною його метаболізму в старості. Зважаючи на те, що в печінці старих щурів спостерігається різке підвищення базального вмісту холестерину, порівняно з молодими тваринами слід гадати, що камілофлан знижує його рівень через посилення перетворення в жовчні кислоти і їх виведення з жовчю. На користь цього припущення свідчать отримані раніше дані про нормалізацію під дією флавоноїдів підвищеного вмісту холестерину в плазмі крові тварин за умов гострого токсичного ураження печінки CCl_4 [1]. У дослідях на щурах і морських свинках було показано, що флавоноїди винограду (кверцетин, мірицетин, кемпферол, резвератрол) і флавоноїди *Solanum melongena* значно знижують цей показник у плазмі крові тварин [20, 23]. Авторами доведено, що важливою причиною зниження вмісту холестерину під дією флавоноїдів є його посилене перетворення в жовчні кислоти і

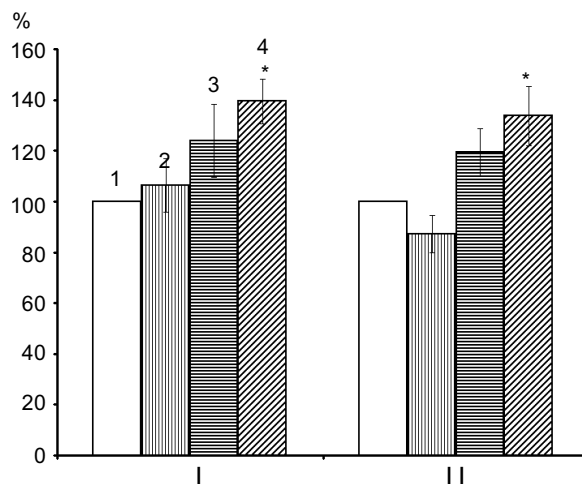


Рис. 1. Вплив камілофлану на секрецію жовчі у статевозрілих (I) і старих (II) щурів.

Результати наведено у відсотках від загальної кількості жовчі контрольних тварин за 4 год експерименту: 1 – контроль, 2, 3, 4 – камілофлан (20, 40 мг/кг і 80 мг/кг відповідно).

$P < 0,05$ щодо контролю

виведення з жовчю та фекаліями. У дослідах на щурах було встановлено, що флавоноїд силімарин, змінюючи рівень продукції окремих жовчних кислот (β -мурихолевої та урсодезоксихолевої), що мають гепатопротекторні властивості, збільшує секрецію жовчі. За умов холестазу, викликаного введенням тауролітохолату чи 17α -етинілестрадіолу, цей флавоноїд підсилює каналікулярний транспорт і призводить до збільшення загального пулу жовчних солей у жовчі і до посилення біліарної секреції HCO_3^- і глутатіону [9, 10]. На культурі гепатоцитів показано, що лютеолін і лютеолін-7-О-глікозид стимулюють біліарну секрецію клітин печінки і здатні запобігати зміні структури каналікулярної мембрани гепатоцитів, викликаній тауролітохолатом [12]. Таким чином, зважаючи на те, що жовчні кислоти є стимуляторами холерезу [4], а флавоноїди підсилюють каналікулярний транспорт і загальне виведення жовчних кислот, а також змінюють їх склад, можна припустити, що під дією рослинних флавоноїдів жовчні кислоти стимулюють секрецію жовчі.

Ще один можливий механізм жовчогінної дії флавоноїдів пов'язаний, імовірно, з їх інсуліноподібним ефектом. Відомо, що інсулін стимулює опосередковано холерез через створення гіпоглікемічного стану

організму, у результаті чого підвищується тонус блукаючих нервів і відбувається стимуляція жовчовиділення [3]. В експериментах на культурі клітин HepG2 встановлено, що інсулін і нарингенін (структурний аналог апігеніну) підвищують активність клітинної фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3 K) [8]. Інгібування останньої призводить до зниження ендоцитозу і трансклітинного транспорту маркерів рідкої фази жовчі в печінці, викликає ранню дилатацію каналікулярних просторів і дезорганізацію мікрофіламентів. Порушення везикулярного транспорту може супроводжуватися зміною обміну і включенням у каналікулярну мембрану таких апікальних транспортних білків, як Cl^- - HCO_3^- -обмінника, чи каналікулярного транспортера жовчних солей. Зазначені наслідки інгібування PI3 K призводять до зниження базального потоку жовчі [11].

Таким чином, у цій роботі встановлено, що флавоноїди *Chamomilla recutita* (L) чинять дозозалежний стимулювальний вплив на холерез щурів різного віку. Під впливом камілофлану відбувається посилення біліарної екскреції жовчних кислот і у статевозрілих, і у старих тварин. Введення цього препарату не впливає на вміст холестерину в печінці і на його виведення з жовчю у 3-місячних щурів. Разом з тим у

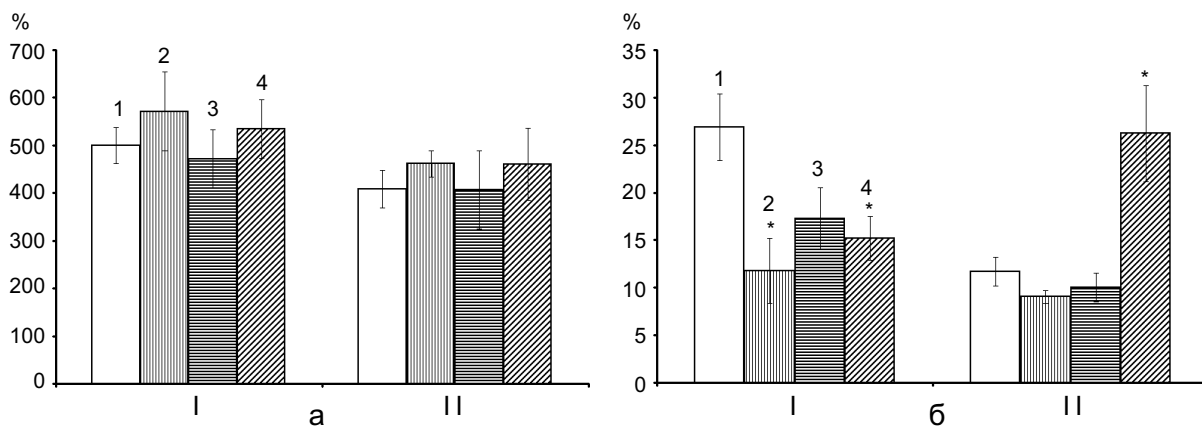


Рис. 2. Вплив камілофлану на концентрацію жовчних кислот (а) та холестерину (б) в жовчі статевозрілих (I) і старих (II) щурів: 1 – контроль, 2, 3, 4 – камілофлан (20, 40 і 80 мг/кг відповідно).

P < 0,05 щодо контролю

печінці старих тварин він знижує підвищений з віком вміст холестерину до рівня молодих і підсилює його біліарну екскрецію. Очевидно, камілофлан стимулює обмін холестерину в організмі (порушений з віком у старих тварин), посилює процеси його перетворення в жовчні кислоти і виведення їх з жовчю, наслідком чого є посилення холерезу.

N. Babenko, E. Shachova

AGE-RELATED EXOCRINE FUNCTION OF LIVER UNDER THE FLAVONOIDS ACTIONS

The effects of the chamomilla recutita (l) flavonoids (chamiloflan) on bilegenesis of the adult and old white rats were investigated. Chamiloflan (20, 40 and 80 mg/kg) induced a dose-dependent increase in the bile flow and bile acid secretion in rats of both age groups. Cholesterol concentration in the liver and bile cholesterol secretion were not changed in the treated adult rats. Chamiloflan increased cholesterol bile secretion and reduced lipid content in the liver of the old rats.

Kharkiv National University named after V.N. Karazin

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Бабенко Н.О., Нікітіна Н.С., Вередіна О.Г. Вплив камілофлану на функціональний стан печінки // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 1999. – № 4. – С. 16–22.
- Валенкевич Л.Н. Изменение функции печени при старении человека // Физиол. человека. – 1981. – 7, № 1. – С. 166–167.
- Ганиткевич Я.В. Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма. – К., Наук. думка, 1980. – 178 с.
- Говоруха Т.М., Назаренко А.І., Жаліло Л.І. та ін. Порушення процесів жовчовиділення при тканинній гіпоксії та спроби їх корекції // Фізіол. журн. – 2002. – 48, № 1. – С. 35–40.
- Громашевська Л.Л., Мірошніченко В.П., Сіденко О.Ю. Визначення загального вмісту жовчних кислот, холестерину в жовчі. Холато-холестеринний коефіцієнт // Лаб. діагностика. – 1998. – 1, № 3. – С. 47–48.
- Синельник Т.Б., Синельник О.Д., Рибальченко В.К. Жовчні кислоти в процесах утворення каналцевої жовчі // Фізіол. журн. – 2003. – 49, № 6. – С. 80–93.
- Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – 37, № 8. – P. 911–917.
- Borradaile N.M., Dreu L.E., Huff M.W. Inhibition of Net HepG2 cell apolipoprotein B secretion by the citrus flavonoid naringenin involves activation of phosphatidylinositol 3-kinase, independent of insulin receptor substrate-1 phosphorylation // Diabetes. – 2003. – 52. – P. 2554–2561.
- Crocenzi F.A., Sanchez Pozzi E.J., Pellegrino J.M. et al. Beneficial effect of silymarin on estrogen-induced cholestasis in the rat // Hepatology. – 2001. – 34, № 2. – P. 329–339.
- Crocenzi F.A., Sanchez Pozzi E.J., Pellegrino J.M. et al. Preventive effect of silymarin against taurocholate-induced cholestasis in the rat // Biochem. Pharmacol. – 2003. – 66, № 2. – P. 355–364.
- Folli F., Alvaro D., Gigliozzi A. et al. Regulation of endocytic-transcytotic pathways and bile secretion by phosphatidylinositol 3-kinase in rats // Gastroenterology. – 1997. – 113. – P. 954–965.
- Gebhardt R. Anticholestatic activity of flavonoids from artichoke (Cynara scolymus L.) and of their metabolites // Med. Sci. Monit. – 2001. – 7, № 1. – P. 316–320.
- Hashimoto M., Shahdat M.N., Shimada T. et al. Relationship between age-related increases in rat liver lipid peroxidation and bile canalicular plasma membrane fluidity // Exp. Gerontology. – 2001. – 37, № 1. – P. 89–97.
- Kanai S., Kitani K., Nokubo M. The age-dependent decline in the biliary transport maximum of conjugated sulfobromphthalein in the rat // Arch. Gerontol. Geriatr. – 1988. – 7, № 1. – P. 1–8.
- Kroker R., Hegner D., Anwer M.S. Altered hepatobiliary of taurocholic acid aged rats // Mech. Ageing Dev. – 1980. – 12, № 4. – P. 367–373.
- Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193. – P. 365–375.
- March J.B., Weinstein D.B. Simple charring method for determination of lipids // J. Lipid Res. – 1966. – 7, № 4. – P. 574–580.
- Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer // Pharmacol. Rev. – 2000. – 52, № 4. – P. 673–751.
- Suchy F.J., Sippel C.J., Ananthanarayanan M. Bile acid transport across the hepatocyte canalicular membrane // FASEBJ. – 1997. – 11. – P. 199–205.
- Sudheesh S., Presannakumar G., Vijayakumar S., Vijayalakshmi N.R. Hypolipidemic effect of flavonoids from Solanum melongena // Plant Foods Hum Nutr. – 1997. – 51, № 4. – P. 321–330.
- Uchida K., Chikai T., Takase H. et al. Age-related changes of bile acid metabolism in rats // Arch. Gerontol. Geriatr. – 1990. – 10, № 1. – P. 37–48.
- Uchida K., Nomura Y., Kadowaki M. et al. Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats // J. Lipid Res. – 1978. – 19. – P. 544–552.
- Zern T.L., West K.L., Fernandez M.L. Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs // J. Nutriol. – 2003. – 133, № 7. – P. 2268–2272.

Харків. нац. ун-т ім. В.Н.Каразіна М-ва освіти та науки України

Матеріал надійшов до редакції 03.11.2004