

Вплив різних поліфенолів на порушення обміну холестерину в умовах інсулінорезистентності

В.П. Филимоненко, А.Л. Загайко

Національний фармацевтичний університет, Харків; e-mail: vpfylymonenko@gmail.com

Вивчали вплив лікувально-профілактичного введення кверцетину, епігалокатехіну галату та поліфенольного екстракту з плодів винограду на зміни показників обміну холестерину у сироватці крові щурів в умовах інсулінорезистентності. Виявлено розвиток атерогенної дисліпопротеїемії: накопичення загального холестерину (у 2,12 раза) за рахунок зростання вмісту холестерину ліпопротеїнів дуже низької щільності (у 1,75 раза), зниження концентрації холестерину ліпопротеїнів високої щільності (у 2,6 раза) та підвищення індексу атерогенності (у 8,8 раза) у тварин з високофруктозною дієтою. Застосування всіх вивчених поліфенолів по-різному нормалізувало показники холестеринового обміну. Поліфенольний екстракт з винограду виявив більш виражені захисні властивості, очевидно, завдяки різноманітнішому складу і, відповідно, механізм корекції інсулінорезистентності.

Ключові слова: інсулінорезистентність; обмін холестерину; поліфеноли винограду; кверцетин; епігалокатехін галат.

ВСТУП

Інсулінорезистентність – зниження чутливості клітин до гормону через зменшення кількості рецепторів чи порушення рецепторної або пострецепторної передачі інсулінового сигналу, що провокує формування низки метаболічних розладів [1]. Вона є одним з провідних факторів розвитку цукрового діабету 2-го типу, метаболічного синдрому, атеросклерозу, серцево-судинних захворювань та їх наслідків, що посідають перше місце серед причин смертності у розвинених країнах [2]. Тому дослідження механізмів розвитку та можливих шляхів корекції інсулінорезистентності є вкрай актуальним. Цей стан характеризується порушенням усіх видів метаболізму, перш за все вуглеводного та ліпідного, активацією вільнорадикального окиснення та розвитком прозапального стану. Відомо, що поліфеноли, біологічно активні сполуки рослинного походження, завдяки своїм потужним антиоксидантним, протизапальним, антипроліферативним та антиапоптозним властивостям значно послаблюють

© В.П. Филимоненко, А.Л. Загайко

метаболічні зміни за інсулінорезистентності [3-6].

Метою нашого дослідження було порівняльне вивчення впливу лікувально-профілактичного введення кверцетину, епігалокатехіну галату та поліфенольного екстракту з плодів винограду на вміст загального холестерину та холестерину у фракціях ліпопротеїнів у сироватці крові щурів в умовах інсулінорезистентності.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на самцях щурів популяції Вістар масою 180-200 г. Інсулінорезистентність моделювали утриманням тварин на дієті, збагаченій фруктозою (60,3 % фруктози, 18,3 % білка, 5,2 % жирів) [7]. Кверцетин (ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ») вводили щоденно внутрішньошлунково в дозі 50 мг/кг маси тіла, епігалокатехін галат («Sigma-Aldrich», США) – 30 мг/кг, поліфенольний екстракт з плодів винограду – 9 мг поліфенолів/100 г. Дослідні тварини були розділені на 8 груп: 1-ша – інтактні тварини,

яких утримували на стандартному раціоні віварію; 2-га – тварини, які перебували на високофруктозній дієті протягом 6 тиж; 3 групи тварин, які отримували 2 тиж суспензії кверцетину, епігалокатехіну галату і концентрату поліфенолів винограду та 3 групи тварин, яких утримували протягом 4 тиж на високофруктозній дієті й 2 тиж на даній дієті зі щоденним внутрішньошлунковим введенням суспензій досліджених речовин.

Тварин декапітували під хлоразоло-уретановим наркозом. Об'єктом дослідження була сироватка крові тварин. При виконанні експериментів дотримувалися «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), гармонізованих з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Розвиток інсулінорезистентності верифікували, розраховуючи коефіцієнт інсулінорезистентності за допомогою алгоритму НОМА (Homeostasis Model Assessment). Концентрацію загального холестерину та холестерину у фракціях ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ), низької щільності (ЛПНЩ) та високої щільності (ЛПВЩ) визначали за допомогою стандартних ферментативних холестериноксидазних наборів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна). За отриманими результатами розраховували індекс атерогенності (ІА) за формулою $IA = (\text{загальний холестерин} - \text{холестерин ЛПВЩ}) / \text{холестерин ЛПВЩ}$. Статистичну обробку проводили з використанням програми «Statistica» (Statsoft Inc., США, версія 6.0). Значимість міжгрупових відмінностей оцінювали за непараметричним критерієм Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В наших експериментах встановлено підвищення концентрації загального холестерину у 2,12 раза. При чому це відбувалося

за рахунок нагромадження ЛПДНЩ. Вміст холестерину ЛПДНЩ зростав у 1,75 раза, а ЛПВЩ – достовірно знижувався на 39 % (таблиця).

Відомо, що тривале утримання щурів на високофруктозній дієті викликало розвиток інсулінорезистентності, як продемонстровано в паралельних експериментах. Формування нечутливості до інсуліну є наслідком збільшення об'єму адипоцитів при ожирінні, спричиненому надлишком фруктози, котре супроводжувалося зменшенням кількості інсулінових рецепторів у плазматичній мембрані та порушенням ранніх етапів трансдукції інсулінового сигналу [8], що спричинювало гіперглікемію. Накопичення глюкози у крові також розвивається внаслідок пригнічення фруктозою поглинання глюкози печінкою та активацією її вивільнення [9]. Токсичність надмірної кількості глюкози полягає у активації вільнорадикального окиснення різними шляхами, в тому числі через індукцію запальних шляхів, а також у безпосередньому неферментативному глікозилюванні білків й порушенні їх функціонування [10]. Гіперглікемія та інсулінорезистентність неминуче супроводжується порушенням ліпідного обміну.

Гіперліпідемія за умов гіперфруктозної дієти розвивається завдяки підсиленню синтезу нових ліпідів (жирних кислот, триацилгліцеролів, холестерину та його ефірів) з фруктози, яка на відміну від глюкози не потребує інсуліну і тому у надлишку поглинається клітинами печінки [1, 9]. Паралельно з цим, в умовах інсулінорезистентності активується ліполіз та мобілізація жиру з жирової тканини. У крові значно зростає вміст вільних жирних кислот, які інтенсивно надходять до тканин та виступають іншим джерелом для синтезу нових ліпідів, порушуючи поглинання та внутрішньоклітинний обмін глюкози, погіршуючи гіперглікемію та резистентність до інсуліну, що породжує «замкнуте коло» метаболічних порушень [2]. Зменшення вмісту холестерину антиатеро-

Показники обміну холестерину у сироватці крові щурів за умов утримання на високофруктозній дієті та введенні досліджуваних сполук ($M \pm m$, $n=6$).

Групи тварин	Загальний холестерин, ммоль/л	Холестерин ліпопротеїнів, ммоль/л			Індекс атерогенності, ум. од.
		високої щільності,	низької щільності,	дуже низької щільності,	
Інтактний контроль	1,57±0,04	0,67±0,04	0,77±0,06	0,65±0,19	1,34±0,15
Високофруктозна дієта	3,34±0,04*	0,26±0,02*	0,84±0,06	1,14±0,29*	11,85±1,77*
Кверцетин	1,53±0,08	0,64±0,05	0,73±0,12	0,53±0,06	1,39±0,17
Епігалокатехін галат	1,71±0,07	0,73±0,04	0,69±0,08	0,68±0,05	1,34±0,12
Поліфенольний екстракт винограду	1,64±0,10	0,67±0,07	0,75±0,09	0,59±0,07	1,45±0,22
Високофруктозна дієта і введення					
кверцетину	1,96±0,15*,**	0,43±0,15*,**	0,81±0,11	0,77±0,29**	3,56±0,47*,**
епігалокатехіну галату	2,04±0,09*,**	0,47±0,15*,**	0,79±0,07	0,84±0,29**	3,34±0,23*,**
поліфенольного екстракту винограду	1,77±0,18*,**	0,54±0,08*,**	0,78±0,08	0,69±0,29**	2,28±0,34*,**

* $P \leq 0,05$ відносно інтактного контролю, ** $P \leq 0,05$ відносно високофруктозної дієти.

генних ЛПВЩ, ймовірно, пов'язане з їх окисним ушкодженням та швидшим видаленням з кров'яного руслу. Встановлені накопичення холестерину ЛПДНЩ та зниження вмісту холестерину ЛПВЩ на фоні хронічної гіперглікемії являють собою високий ризик розвитку атеросклерозу, що підтверджується значним зростанням індексу атерогенності при утриманні тварин на фруктозній дієті (див. таблицю).

Лікувально-профілактичне введення кверцетину, епігалокатехіну галату та поліфенолів винограду виявляє нормалізуючий вплив на показники обміну холестерину. Так, гіперхолестеринемія при введенні поліфенольних субстанцій знижувалася на 39-47%. Вміст холестерину ЛПВЩ при дії кверцетину на тлі фруктозної дієти підвищувався до 65% від контрольного значення, під дією епігалокатехіну галату – до 81%. Найефективніше, майже до контрольного, відновлювало його вміст введення поліфенолів винограду, відповідно, дещо кращий вплив цих поліфенолів спостерігався на індекс атерогенності. Нормалізація концентрації холестерину ЛПДНЩ була приблизно однаковою при введенні всіх досліджених субстанцій поліфенолів. Окреме

їх введення здоровим тваринам не впливало на жоден з вивчених показників (див. таблицю). Встановлені захисні ефекти вивчених субстанцій зумовлені низкою антиоксидантних, антизапальних, антидіабетичних та гіполіпідемічних властивостей поліфенолів.

Відомо, що кверцетин прискорює поглинання глюкози клітинами печінки і скелетних м'язів та її утилізацію, тобто запобігає гіперглікемії [6]. Більше того, він підсилює поглинання ліпідів жировою тканиною та їх окиснення, модулюючи сигнальні шляхи, які беруть участь у розвитку запалення та резистентності до інсуліну за високофруктозної дієти, та підвищує плазмовий вміст адипонектину [11]. Показано, що кверцетин збільшує кількість мітохондрій у міоцитах та покращує їх функціонування, а також роз'єднує окисне фосфорилування, таким чином сприяючи збільшенню витрат енергії, зменшенню ожиріння й гіперліпідемії та інсулінорезистентності [12]. Вагомий протекторний ефект кверцетин чинить також за рахунок своїх потужних антиоксидантних властивостей – здатності взаємодіяти як з активними метаболітами кисню, так із пероксидними радикалами ліпідів, а також пригнічувати

активності ферментів, що генерують активні метаболіти кисню (НАДФН-оксидази, ксантиноксидази та мієлопероксидази), і активувати антиоксидантні ферменти (супероксидисмутазу, глутатіонпероксидазу та каталазу) [6].

Захисний ефект епігалокатехіну галату зумовлений як гіпоглікемічними, так й гіполіпідемічними властивостями – зниження вмісту триацилгліцеролів та холестерину пов'язують з інгібуванням всмоктування ліпідів у кишечнику та активацією окиснення ліпідів [13]. Також він здатний інгібувати ключовий фермент синтезу холестерину гідроксиметилглутарил-КоА-редуктазу [3]. Крім того, у антидіабетичні ефекти цього поліфенолу роблять свій внесок й антиоксидантні та антизапальні властивості [3, 14].

Поліфенольний концентрат винограду виявляє більш виражений захисний вплив щодо показників обміну холестерину, очевидно, завдяки різноманітнішому складу і, відповідно, механізмам попередження та лікування інсулінорезистентності та дисліпідемії. Крім кверцетину та епігалокатехіну галату до складу поліфенольного екстракту винограду входять й інші представники поліфенолів: флавоноїди (антоціани, рутин, катехіни, проантоціанідини, таніни) та нефлавоноїди (галола, бузкова, кавова і елагова кислоти, ресвератрол). Кожен з компонентів концентрату виявляє низку протекторних властивостей, що загалом й надає потужніших ефектів субстанції.

Так, відомо, що антоціанідини, модулюючи сигнальні шляхи, нормалізують глюкозно-інсуліновий гомеостаз [6, 15]. Їх гіполіпідемічний вплив зумовлений інгібуванням ацил-КоА-карбоксилази-1, тобто синтезу жирних кислот в жировій тканині і печінці, активацією окиснення ліпідів та підсиленням виведення холестерину з жовчу [6, 16]. Рутин посилює поглинання глюкози м'язовими клітинами, а також зменшує гіперліпідемію, пригнічуючи продукцію ФНП- α та ІЛ-6 [5, 6]. Катехін також підсилює надходження глюкози в клітини та стимулює утворення

адипонектину [6]. Ресвератрол підвищує вміст транспортерів глюкози GLUT4 та її надходження до клітин, пригнічує експресію PPAR- γ [6], запобігає окисненню ЛПНЩ та активує ферменти ЛПВЩ, відновлюючи їх активність [17]. Галола кислота нормалізує гомеостаз глюкози та інсуліну [18], а також ліпідний профіль, активуючи сигнальний шлях AMPK/Sirt1/PGC1- α [19]. Крім того, поліфеноли винограду є інгібіторами ферментів гідролізу вуглеводів та переносника глюкози GLUT1 у шлуново-кишковому тракті, тобто знижують утворення та всмоктування глюкози в кишечнику [15], інгібують утворення прозапальних факторів [4]. Не менш важливими є антиоксидантні потужності компонентів поліфенольного екстракту [3-5]. Поліфеноли пригнічують процеси ПОЛ як на стадії ініціації, так і подовження ланцюга (безпосередньо інактивують радикали, і, проникаючи у гідрофобну ділянку мембран, значно знижують рухливість ліпідів, що зменшує ефективність взаємодії пероксидних радикалів з новими молекулами), інгібують ферменти утворення АФК та стимулюють антиоксидантні ферментні системи. До того ж, поліфенольні сполуки діють як хелатори металів зі змінною валентністю, а також захищають аскорбінову кислоту і α -токоферол від окиснення та відновлюють їх окиснені форми.

Таким чином, отримані результати свідчать, що утримання шурів на високофруктозній дієті спричинило розвиток атерогенної дисліпопротеїнемії. Лікувально-профілактичне введення кверцетину, епігалокатехіну галату та поліфенолів винограду частково усунуло порушення холестеринного гомеостазу, що пов'язано з множинними ефектами поліфенолів на різні ланки патогенезу інсулінорезистентності. Поліфенольний екстракт з винограду виявив більш виражений вплив на вивчені показники, ймовірно, завдяки синергічності та адитивності дії численних компонентів екстракту.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated

with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co authors of the article.

В.П. Филимоненко, А.Л. Загайко

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ НА НАРУШЕНИЕ ОБМЕНА ХОЛЕСТЕРИНА В УСЛОВИЯХ ИНСУЛИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Изучали влияние лечебно-профилактического введения кверцетина, эпигаллокатехин галата и полифенольного экстракта из плодов винограда на изменения показателей обмена холестерина в сыворотке крови крыс в условиях инсулинорезистентности. Выявлено развитие атерогенной дислипотеинемии: накопление общего холестерина (в 2,12 раза) за счет роста содержания холестерина липопротеинов очень низкой плотности (в 1,75 раза), снижение концентрации холестерина липопротеинов высокой плотности (в 2,6 раза) и повышение индекса атерогенности (в 8,8 раза) у животных на высокофруктозной диете. Применение всех изученных полифенолов по-разному нормализовало показатели холестеринного обмена. Полифенольный экстракт винограда проявил более выраженные защитные свойства, очевидно, благодаря разнообразию состава и, соответственно, механизмам коррекции инсулинорезистентности.

Ключевые слова: инсулинорезистентность; обмен холестерина; полифенолы винограда; кверцетин; эпигаллокатехин галат.

V.P. Fylymonenko, A.L. Zagayko

VARIOUS POLYPHENOLS IMPACT ON DISTURBANCE OF CHOLESTEROL METABOLISM UNDER INSULIN RESISTANCE

Effect of quercetin, epigallocatechin gallate and polyphenol extract from grapes administration on the changes in cholesterol metabolism in the rat blood serum under insulin resistance was studied. The development of atherogenic dyslipoproteinemia has been revealed: the accumulation of total cholesterol (2.12 times) due to the increase of very low density lipoproteins cholesterol content (1.75 times), the decrease of high density lipoproteins cholesterol concentration (2.6 times) and the increase of the atherogenic index (8.8 times) in animals on a high-fructose diet. The use of all studied polyphenols normalized the indicators of cholesterol metabolism in a different degree. Polyphenolic grape extract showed more pronounced protective properties, obviously due to the variety of composition and, accordingly, the mechanisms of insulin resistance correction.

Key words: insulin resistance; cholesterol metabolism; grape polyphenols; quercetin; epigallocatechin gallate.

*National University of Pharmacy, Kharkiv;
e-mail: vpfylymonenko@gmail.com*

REFERENCES

1. Zagajko AL, Voronina LM, Strel'chenko KV. Metabolic syndrome: mechanisms and prospects of antioxidant therapy: Monograph. Harkiv: Vyd-vo NfaU: Zoloti storky. 2007. 216 p. [Ukrainian].
2. Gallagher EJ, Leroith D, Karnieli E. The metabolic syndrome – from insulin resistance to obesity and diabetes. *Med Clin North Am.* 2011 Sep;95(5):855-73. doi: 10.1016/j.mcna.2011.06.001. PMID: 21855696.
3. Khurana S, Venkataraman K, Hollingsworth A, Piche M, Tai TC. Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging. *Nutrients.* 2013 Oct; 5(10): 3779-3827. Published online 2013 Sep 26. doi: 10.3390/nu5103779 PMID: PMC3820045.
4. Rasines-Perea Z, Teissedre P-L. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiovascular Diseases and Diabetes. *Molecules.* 2017; 22(1), 68: doi:10.3390/molecules22010068
5. Vinayagam R, Xu B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutrition & Metabolism.* 2015;12:60 doi: 10.1186/s12986-015-0057-7.
6. Hossain MK, Dayem AA, Han J, Yin Y, Kim K, Saha SK, Yang G-M, Choi HY, Cho S-G. Molecular Mechanisms of the Anti-Obesity and Anti-Diabetic Properties of Flavonoids. *Int J Mol Sci.* 2016 Apr; 17(4): 569. Published online 2016 Apr 15. doi: 10.3390/ijms17040569. PMID: PMC4849025.
7. Altaş M, Var A, Köse C; Özbilgin, K, Arı Z. Endothelial dysfunction in high fructose containing diet fed rats: Increased nitric oxide and decreased endothelin-1 levels in liver tissue. *Dicle Medical Journal / Dicle Tip Dergisi;* 2010; 37(3):193-8.
8. Bezerra RM, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJ. A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J Nutr.* 2000 Jun; 130(6):1531-5. PMID: 10827205.
9. Zhang DM, Jiao RQ, Kong LD. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients.* 2017 Mar 29;9(4). pii: E335. doi: 10.3390/nu9040335.
10. Yan L.-J. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *J Diabetes Res.* 2014; 2014: 137919. Published online 2014 Jun 16. doi: 10.1155/2014/137919. PMID: PMC4082845
11. Vazquez Prieto MA, Bettaieb A, Rodriguez Lanzi C, Soto VC, Perdicaro DJ, Galmarini CR, Haj FG, Miatello RM, Oteiza PI. Catechin and quercetin attenuate adipose inflammation in fructose-fed rats and 3T3-L1 adipocytes. *Mol Nutr Food Res.* 2015 Apr; 59(4):622-33. doi: 10.1002/mnfr.201400631
12. Henagan TM, Cefalu WT, Ribnicky DM, Noland RC, Dunville K, Campbell WW, Stewart LK, Forney LA, Gettys TW, Chang JS, Morrison CD. In vivo effects of dietary quercetin and quercetin-rich red onion extract on skeletal muscle mitochondria, metabolism, and insulin

- sensitivity. *Genes Nutr.* 2015 Jan; 10(1): 2. Published online 2014 Dec 27. doi: 10.1007/s12263-014-0451-1. PMID: PMC4277553.
13. Chen Y-K, Cheung C, Reuhl KR., Liu AB, Lee M-J, Lu Y-P, Yang CS. Effects of Green Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-gallate on a Newly Developed High-fat/Western-style Diet-induced Obesity and Metabolic Syndrome in Mice. *J Agric Food Chem.* 2011 Nov 9; 59(21): 11862-71. Published online 2011 Oct 18. doi: 10.1021/jf2029016 PMID: PMC3243651 NIHMSID: NIHMS332936.
 14. Legeay S, Rodier M, Fillon L, Faure S, Clere N. Epigallocatechin Gallate: A Review of Its Beneficial Properties to Prevent Metabolic Syndrome. *Nutrients.* 2015 Jul 7; 7(7):5443-68. doi: 10.3390/nu7075230. PMID: 26198245 PMID: PMC4517007.
 15. Kim Y, Keogh JB, Clifton PM. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients.* 2016 Jan; 8(1): 17. Published online 2016 Jan 5. doi: 10.3390/nu8010017. PMID: PMC4728631
 16. Downing LE, Heidker RM, Caiozzi GC, Wong BS, Rodriguez K, Del Rey F, Ricketts ML. A Grape Seed Procyanidin Extract Ameliorates Fructose-Induced Hypertriglyceridemia in Rats via Enhanced Fecal Bile Acid and Cholesterol Excretion and Inhibition of Hepatic Lipogenesis. *PLoS One.* 2015 Oct 12;10(10):e0140267. doi: 10.1371/journal.pone.0140267. eCollection 2015. PMID: 26458107 PMID: PMC4601771.
 17. Zagayko AL, Kravchenko GB, Krasilnikova OA, Ogai YO. Grape Polyphenols Increase the Activity of HDL Enzymes in Old and Obese Rats. *Oxid Med Cell Longevity.* Volume 2013 (2013), Article ID 593761, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/593761>.
 18. Doan KV, Ko CM, Kinyua AW, Yang DJ, Choi YH, Oh IY, Nguyen NM, Ko A, Choi JW, Jeong Y, Jung MH, Cho WG, Xu S, Park KS, Park WJ, Choi SY, Kim HS, Moh SH, Kim KW. Gallic acid regulates body weight and glucose homeostasis through AMPK activation. *Endocrinology.* 2015 Jan; 156(1):157-68. doi: 10.1210/en.2014-1354. PMID: 25356824.
 19. Rafeirad M, Chehardacheric SV, Nezhad NN. Hypo-lipidemic effects of gallic acid in diabetic rats. *Journal of pharmaceutical and biomedical sciences. J Pharm Biomed Sci.* 2013 July; 32(32): 1309-1312.

Матеріал надійшов до редакції 25.04.2017