

# ЛАБОРАТОРНЫЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.217.5:612.73:612.351.5:599.323.4

## ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА И АРАБИНОГАЛАКТАНА НА СОКРАЩЕНИЕ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК ВОРОТНОЙ ВЕНЫ КРЫС

А.Ю. Шаманаев<sup>1</sup>, А.В. Сидехменова<sup>1</sup>, Е.В. Новикова<sup>2</sup>, А.В. Носарев<sup>2,4</sup>, М.Б. Плотников<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ "НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга" СО РАМН, Томск

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО "Сибирский государственный медицинский университет" Минздрава России, Томск

<sup>3</sup>ГБОУ ВПО "Национальный исследовательский Томский государственный университет"

<sup>4</sup>ГБОУ ВПО "Национальный исследовательский Томский политехнический университет"

E-mail: sham\_man@mail.ru

## INFLUENCE OF THE DIHYDROQUERCETIN AND ARABINOGALACTAN COMPOSITION ON THE CONTRACTION OF RAT'S PORTAL VEIN SMOOTH MUSCLE CELLS

A.Ju. Shamanaev<sup>1</sup>, A.V. Sidehmenova<sup>1</sup>, E.V. Novikova<sup>2</sup>, A.V. Nosarev<sup>2,4</sup>, M.B. Plotnikov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>"E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology" SB RAMS, Tomsk

<sup>2</sup>Siberian State Medical University, Tomsk

<sup>3</sup>National Research Tomsk State University

<sup>4</sup>National Research Tomsk Polytechnic University

Цель работы: оценка влияния композиции дигидрокверцетина (ДГК) и арабиногалактана (АГ) на сокращение гладкомышечных клеток (ГМК) воротной вены крыс. Сократительную активность сегментов воротной вены изучали методом механографии на экспериментальной установке с прецизионным датчиком силы FT10g. Сократительный ответ ГМК на добавление 40 мМ КСl и 10<sup>-5</sup>М фенилэфрина оценивали после 20 мин преинкубации с ДГК (0,001%), АГ (0,005%) и их композиции в соотношении 1:5 (0,006%). Амплитуда КСl-индуцированного сокращения после преинкубации с ДГК составила 61,0±5,2% от исходного. Использование композиции ДГК и АГ снизило угнетающий эффект первого на КСl-индуцируемое сокращение. При этом все исследуемые субстанции подавляли сокращение ГМК, индуцируемое фенилэфрином.

**Ключевые слова:** дигидрокверцетин, арабиногалактан, гладкомышечные клетки, воротная вена крыс.

The aim of the study was to evaluate influence of the dihydroquercetin (DQ) and arabinogalactan (AG) composition on the contraction of murine portal vein smooth muscle cells (SMC). The contractile activity of the rat portal vein segments was investigated by the mechanographic method by using a device with mechano-electrical transducer (FT10g, World Precision Instruments, Inc. USA). The SMC contractile responses to 40-mM KCl and 10-mM phenylephrine were evaluated after 20 min pre-incubation with DQ (0.001%), AG (0.005%), and their composition with ratio of 1:5 (0.006%). The amplitude of KCl-induced contraction after pre-incubation with DQ was 61.0±5.2% of the initial contraction. Treatment with the composition of DQ and AG reduced the inhibitory effect of DQ on the KCl-induced contraction. Studied substances and their composition suppressed SMC contractions induced by phenylephrine.

**Key words:** dihydroquercetin, arabinogalactan, smooth muscle cells, portal vein.

### Введение

Дигидрокверцетин (ДГК) – известный флавоноид, обладающий противовоспалительными, противоотечными, ангиопротекторными и другими свойствами, делающими его перспективным для разработки флебопротекторного средства [1]. Ранее было показано, что ДГК не оказывает прямого влияния на тонус изолированной воротной вены, но снижает амплитуду ее сократительного

ответа на КСl и норадреналин [3]. С другой стороны, расслабляющий эффект на сосуды у ДГК меньше в сравнении с большинством других флавоноидов [11].

В недавних экспериментах была показана возможность модулирования фармакологических эффектов ДГК, благодаря использованию его в композиции с арабиногалактаном (АГ) [4]. Цель работы: оценить влияние ДГК, АГ и их композиции на сокращение ГМК воротной вены крыс.

## Материал и методы

В работе использовали ДГК (98,6%) и АГ (98,7%), выделенные из древесины лиственницы даурской (*Larix dahurica* Turcz.), а также композицию ДГК и АГ в соотношении 1:5 (содержание ДГК и АГ 14,9% и 80,1% соответственно). Субстанции для исследования предоставлены ЗАО “Аметис”.

Эксперименты выполнены на 24 аутбредных крысах самцах Вистар массой 300–350 г, полученных из вивария ФГБУ “НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга” СО РАМН. Животные содержались в пластиковых клетках в стандартных условиях с 12/12 световым циклом и свободным доступом к воде и пище. Крысы подвергались эвтаназии ингаляцией  $\text{CO}_2$ . Затем брюшную полость вскрывали, выделяли фрагмент воротной вены длиной 2–3 см, очищали его от жира и соединительной ткани и промывали в растворе Кребса ( $\text{NaCl}$  – 120,4 мМ;  $\text{KCl}$  – 5,4 мМ;  $\text{CaCl}_2$  – 2,5 мМ;  $\text{MgCl}_2$  – 1,2 мМ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,6 мМ; трис-гидроксиаминометан – 15,5 мМ; глюкоза – 5,5 мМ;  $\text{pH}=7,44$ ) при 25 °С. В работе использовали фрагменты вены в виде колец шириной 2 мм, которые помещали между фиксированным на дне камеры штоком и крючком, соединенным с датчиком силы (FT10g AD Instrument, Ukraine). Для записи миограммы использовался персональный компьютер с 14-битным АЦП L791 (Л-Кард, Москва).

После закрепления фрагмента воротной вены в камере с термостатируемым раствором Кребса ( $35,0 \pm 1,0$  °С) производили его растяжение нагрузкой 250–300 мг и оставляли в течение 45 мин для полной стабилизации. Каждые 15 мин производили смену раствора. Перед тестированием исследуемых веществ трехкратно проверяли реакцию сосуда на введение 40 мМ  $\text{KCl}$ . Для оценки влияния исследуемых субстанций на сокращение ГМК проводили 20-минутную преинкубацию с веществами в следующих концентрациях: ДГК – 0,001%, АГ – 0,005%, композиция ДГК и АГ в соотношении 1:5 – 0,006%. После периода преинкубации индуцировали сокращение ГМК добавлением  $\text{KCl}$  (40 мМ) или фенилэфрина (ФЭ,  $10^{-5}$  М). Исходные амплитуды сокращений приняты за 100%: в первом случае – реакция сосуда на  $\text{KCl}$ , во втором – реакция сосуда на ФЭ.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета программ “STATISTICA 6.0”, достоверность полученных результатов оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Данные представлены в виде

$M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – стандартная ошибка среднего значения.

## Результаты

Исследованные вещества в используемых концентрациях сами по себе не индуцировали сокращение ГМК изолированного сегмента воротной вены крыс.

В концентрации 0,001% ДГК оказывал ингибирующий эффект на сокращение ГМК, индуцированное 40 мМ  $\text{KCl}$  (табл. 1). Амплитуда сокращения снижалась на 39% относительно контроля. Добавление 0,005% АГ, напротив, приводило к достоверному повышению амплитуды гиперкалиевого сокращения на 24%. При использовании композиции ДГК и АГ амплитуда сокращений была достоверно больше на 31% по сравнению с показателями, полученными при инкубации с ДГК в отдельности.

При исследовании влияния ДГК, АГ и их композиции на сокращение ГМК воротной вены крыс, индуцируемое ФЭ, было выявлено, что все исследуемые вещества оказывали выраженное ингибирующее влияние (табл. 2). Амплитуда сокращения после периода инкубации с ДГК снижалась на 70% по сравнению с исходной, с АГ – на 66%, с композицией ДГК и АГ – на 90%.

## Обсуждение

Как известно, многие флавоноиды (кверцетин, кемпферол, нарингенин) ингибируют сократительный ответ гладких мышц сосудов на норадреналин, ФЭ, высокую концентрацию  $\text{KCl}$  и другие стимулы [5, 11].

Деполаризация клетки, вызванная добавлением избытка  $\text{KCl}$ , инициирует открытие потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа и развитие гиперкалиевой контрактуры. Было показано, что ряд флавоноидов (кверцетин, мирицетин) активируют  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа [9]. При этом известно, что кверцетин, несмотря на активацию входа  $\text{Ca}^{2+}$  внутрь клеток, оказывает угнетающее действие на сокращение гладких мышц сосудов [5, 8]. Поэтому наблюдаемое снижение амплитуды  $\text{KCl}$ -индуцированного сокращения после преинкубации с ДГК, возможно, обусловлено другими механизмами, связанными, например, с ингибированием внутриклеточных ферментов. Наблюдаемое повышение амплитуды гиперкалиевого сокращения на фоне АГ, возможно, связано со снижением калиевой проводимости мембраны. Интересно отметить, что использование ДГК в композиции с АГ позволяет снизить

Таблица 1

**Влияние дигидрокверцетина (0,001%), арабиногалактана (0,005%) и их композиции (0,006%) на амплитуду сокращения, вызванного  $\text{KCl}$  (40 мМ)**

Группы	Амплитуда сокращения, %
Дигидрокверцетин, n=8	61,0±5,2
Арабиногалактан, n=8	124,5±6,6*
Композиция дигидрокверцетина и арабиногалактана, n=8	92,0±6,5**

Примечание: \* –  $p < 0,01$  по сравнению с дигидрокверцетином, \*\* –  $p < 0,05$  по сравнению с арабиногалактаном.

Таблица 2

**Влияние дигидрокверцетина (0,001%), арабиногалактана (0,005%) и их композиции (0,006%) на амплитуду сокращения, вызванного ФЭ ( $10^{-5}$  М)**

Группы, n=8	Амплитуда сокращения, %
Дигидрокверцетин	29,6±7,1
Арабиногалактан	34,0±7,2
Композиция дигидрокверцетина и арабиногалактана	9,4±3,8*

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с арабиногалактаном.

угнетающий эффект ДГК на сокращение ГМК воротной вены крыс.

Сокращение ГМК в ответ на добавление катехоламинов вызвано активацией адренергических рецепторов, что приводит к снижению уровня цАМФ и увеличению концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме ГМК [6]. Данные нашего предыдущего эксперимента свидетельствуют об уменьшении сократительного ответа ГМК воротной вены крыс на добавление норадреналина после преинкубации с ДГК [3]. В результате настоящего исследования установлено, что ДГК угнетает сократительный ответ гладких мышц вен на добавление ФЭ, который является агонистом  $\alpha_1$ -адренорецепторов. АГ также снижал амплитуду сокращений ГМК, а при использовании композиции двух веществ этот эффект суммировался.

Как известно, ферментом, разрушающим цАМФ, является цАМФ-зависимая фосфодиэстераза (ФДЭ). В исследованиях *in vitro* было показано, что кверцетин и некоторые другие флавоноиды ингибируют активность ФДЭ, а ДГК, напротив, увеличивает ее активность [7]. Учитывая этот факт, кажутся противоречивыми данные о способности ДГК повышать уровень циклических нуклеотидов и снижать концентрацию  $Ca^{2+}$  в цитоплазме тромбоцитов [2]. К сожалению, в литературе отсутствуют данные о влиянии ДГК на содержание цАМФ и  $Ca^{2+}$  в ГМК. С другой стороны, активность фосфодиэстеразы может не иметь определяющего значения в вазорелаксирующем действии флавоноидов, так как было показано, что повышение уровня цАМФ не изменяет кверцетин-индуцированное расслабление ГМК [5].

Помимо фосфодиэстеразы, важную роль в процессе сокращения играют протеинкиназы, фосфорилирующие белки сократительного аппарата и изменяющие, таким образом, их чувствительность к ионам  $Ca^{2+}$  [6]. Флавоноиды, в том числе и ДГК, ингибируют активность протеинкиназы С и тем самым могут препятствовать увеличению  $Ca^{2+}$ -чувствительности сократительных белков [8, 10].

## Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об угнетающем действии дигидрокверцетина на сократительный ответ гладкомышечных клеток воротной вены крыс на действие различных стимулов (КСЛ, норадреналин, фенилэфрин). Использование ДГК в композиции с АГ позволяет снизить угнетающий эффект ДГК на КСЛ-индуцируемое сокращение гладкомышечных клеток воротной вены крыс. Все исследуемые вещества ингибируют сокращение ГМК, индуцируемое фенилэфрином.

## Литература

1. Колхир В.К., Тюкавкина Н.А., Быков В.А. и др. Диквертин – новое антиоксидантное и капилляропротекторное средство // Хим.-фарм. журн. – 1995. – № 9. – С. 61–64.
2. Кубатиев А.А., Тюкавкина Н.А., Быков В.А. и др. Подавление диквертином АДФ- и тромбин-индуцированного накопления цитоплазматического кальция в тромбоцитах человека // Хим.-фарм. журн. – 1999. – № 12. – С. 3–4.
3. Иванов И.С., Сидехменова А.В., Носарев А.В. и др. Влияние дигидрокверцетина на тонус изолированных вен крыс //

Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2013. – Т. 155, № 1. – С. 71–72.

4. Композиция с повышенной фармакологической активностью на основе дигидрокверцетина и растительных полисахаридов (варианты) : пат. 2421215 Российская Федерация, МПК А61К31/15, А61Р9/14 / А.В. Душкин, Е.С. Метелева, В.П. Тихонов и др.; заявители и патентообладатели Открытое акционерное общество Завод экологической техники и экопитания “ДИОД” (RU). – № 2421215; заявл. 15.04.2010; опубл. 20.06.2011.
5. Duarte J., Perez-Vizcaino F., Zarzuelo A. et al. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle // Eur. J. Pharmacol. – 1993. – Vol. 239, Iss. 1–3. – P. 1–7.
6. Khalil R.A., van Breemen C. Sustained contraction of vascular smooth muscle: calcium influx or C-kinase activation? // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1988. – Vol. 244, No. 2. – P. 537–542.
7. Kuppusamy U.R., Das N.P. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes // Biochem. Pharmacol. – 1992. – Vol. 44, No. 7. – P. 1307–1315.
8. Perez-Vizcaino F., Duarte J., Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols // Free Radic. Res. – 2006. – Vol. 40, No. 10. – P. 1054–1065.
9. Saponara S., Sgaragli G., Fusi F. Quercetin antagonism of Bay K 8644 effects on rat tail artery L-type  $Ca^{2+}$  channels // Eur. J. Pharmacol. – 2008. – Vol. 598, Iss. 1–3. – P. 75–80.
10. Wang Y.H., Wang W.Y., Liao J.F. et al. Prevention of macrophage adhesion molecule-1 (Mac-1)-dependent neutrophil firm adhesion by taxifolin through impairment of protein kinase-dependent NADPH oxidase activation and antagonism of G protein-mediated calcium influx // Biochem. Pharmacol. – 2004. – Vol. 67, No. 12. – P. 2251–2262.
11. Xu Y.C., Leung S.W., Yeung D.K. et al. Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery // Phytochemistry. – 2007. – Vol. 67, No. 8. – P. 1179–1188.

Поступила 25.06.2014

## Сведения об авторах

**Шаманаев Александр Юрьевич**, аспирант лаборатории фармакологии кровообращения ФГБУ “НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга” СО РАМН.

Адрес: 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3.

E-mail: sham\_man@mail.ru

**Сидехменова Анастасия Витальевна**, канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории фармакологии кровообращения ФГБУ “НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга” СО РАМН.

Адрес: 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3.

E-mail: sidehmenova@yandex.ru

**Новикова Екатерина Владимировна**, студентка 6-го курса ГБОУ ВПО “Сибирский государственный медицинский университет” Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

E-mail: tevez712@yandex.ru

**Носарев Алексей Валерьевич**, докт. мед. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики ГБОУ ВПО “Сибирский государственный медицинский университет” Минздрава России.

Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

E-mail: avnosarev@yandex.ru

**Плотников Марк Борисович**, докт. биол. наук, профессор, заведующий лабораторией фармакологии крово-

обращения ФГБУ “НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга” СО РАМН.

Адрес: 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3.  
E-mail: mbp2001@mail.ru

УДК 577.332.23: 539.199

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОАЛМАЗОВ ВЗРЫВНОГО СИНТЕЗА ПРИ СИСТЕМАТИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ИОНОВ НИКЕЛЯ И ХРОМА НА КОЖУ МОРСКИХ СВИНОК

Е.Ю. Васильева<sup>1</sup>, В.И. Прохоренков<sup>1</sup>, А.П. Пузырь<sup>2</sup>, В.С. Бондарь<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО “Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого” Минздрава России

<sup>2</sup>Институт биофизики СО РАН, Красноярск  
E-mail: doctor\_women@mail.ru

## PROTECTIVE EFFECT OF MODIFIED DETONATION-SYNTHESIZED NANODIAMONDS ON NICKEL AND CHROMIUM ION-INDUCED ALLERGIC CONTACT DERMATITIS IN GUINEA PIGS

E.Yu. Vasilyeva<sup>1</sup>, V.I. Prokhorenkov<sup>1</sup>, A.P. Puzyr<sup>2</sup>, V.S. Bondar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Krasnoyarsk State Medical University n.a. Prof. V. F. Voyno-Yasenetsky

<sup>2</sup>Institute of Biophysics of Siberian Branch under the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk

Работа посвящена сравнительному исследованию протекторного эффекта модифицированных наноалмазов (МНА) взрывного синтеза при систематическом воздействии на кожу морских свинок ионов никеля и хрома, индуцирующих развитие аллергического контактного дерматита (АКД). Полученные данные свидетельствуют о том, что МНА обладают защитным эффектом при воздействии на кожу животных ионов никеля. Показано, что протекторный эффект МНА отсутствует при систематическом воздействии на кожу животных ионов хрома. Выявленные различия связаны с разными адсорбционными свойствами МНА к изучаемым ионам. Из результатов атомно-адсорбционной спектроскопии образцов кожи следует, что МНА эффективно связывают ионы никеля и практически не адсорбируют ионы хрома. Обсуждаются перспективы применения МНА как нового адсорбента для профилактики АКД, вызываемого ионами никеля.

**Ключевые слова:** аллергический контактный дерматит, модифицированные наноалмазы взрывного синтеза, ионы никеля и хрома, клинико-морфологическое исследование.

The article presents the comparative study of the protective effects of modified nanodiamonds (MND), obtained by detonation synthesis, on nickel and chromium ion-induced allergic contact dermatitis (ACD) in guinea pigs. Treatment with MND exerted protective effects on guinea pig skin exposed to systematic application of nickel ions. No MND-mediated protective effects were found in case of systematic application of chromium ions on the skin of experimental animals. The differences in the effects were caused by the differential adsorption properties of MND for nickel and chromium ions. Results of atomic-adsorption spectroscopy of the skin samples showed that MND effectively bound nickel ions and did not adsorb chromium ions. The authors discuss prospects of the use of MNA as the new adsorbent agent for prevention ACD caused by nickel ions.

**Key words:** allergic contact dermatitis, modified detonation-synthesized nanodiamonds, nickel and chromium ions, clinical-morphological study.

### Введение

Аллергический контактный дерматит – одно из распространенных заболеваний в дерматологической практике, которое встречается у 2,0–2,5% населения земного шара [5, 12, 17]. В последние годы отмечается неуклонный рост заболеваемости АКД, что связано со значительным увеличением числа химических веществ, используемых в быту и на производстве [12]. Наиболее частой причиной возникновения и развития данного заболевания

является контакт кожи с аллергенами химической природы, например, ионами двухвалентных металлов, такими как кобальт, никель и хром [4, 6, 12]. Важная роль в профилактике АКД принадлежит средствам, способным связывать ионы металлов на поверхности кожи и тем самым нейтрализовать их токсическое действие. Новыми адсорбентами для связывания и нейтрализации аллергенов химической природы на поверхности кожи могут являться модифицированные наноалмазы (МНА) детона-