

УДК 615.03:542.943-92'78:547.458:576.524:616.155.3:616-005.3-036.12-092.9:599.323.4

ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИЦИИ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА И АРАБИНОГАЛАКТАНА НА АДГЕЗИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИ ХРОНИЧЕСКОЙ ВЕНОЗНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У КРЫС

Шаманаев А.Ю., Сидехменова А.В.

ФГБУ «НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга» СО РАМН, Томск, e-mail: sham_man@mail.ru

Хроническая венозная недостаточность (ХВН) нижних конечностей является широко распространенным и трудно корректируемым заболеванием, имеющим тенденцию к увеличению числа больных. Одним из главных патологических факторов развития ХВН является нарушение лейкоцитарно-эндотелиального взаимодействия, что играет важную роль в запуске воспалительного каскада. Целесообразным в данном случае считается применение фармакологических средств с противовоспалительными, антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами. В данной работе используется модель ХВН с частичной окклюзией нижней полой вены у крыс, при которой создается устойчивая гипертензия, а также значимо повышается адгезионная активность лейкоцитов. Курсовой (14 дней) внутрижелудочный прием композиции дигидрокверцетина и арабиногалактана (50 и 250 мг/кг, соответственно) восстанавливает значения адгезии лейкоцитов до показателей ложноперированных животных.

Ключевые слова: адгезионная активность лейкоцитов, хроническая венозная недостаточность, дигидрокверцетин, арабиногалактан

INFLUENCE OF THE DIHYDROQUERCETIN AND ARABINO GALACTAN COMPOSITION ON THE ADHESION OF LEUKOCYTES IN A CHRONIC RAT'S MODEL OF VENOUS INSUFFICIENCY

Shamanaev A.Y., Sidekhmenova A.V.

E.D. Goldberg Research Institute of Pharmacology SB RAMS, Tomsk, e-mail: sham_man@mail.ru

Chronic venous insufficiency (CVI) of lower limbs is widely prevalent and intractable disease with tendency of growing the number of patients. The pathogenesis of CVI involves changes in leukocyte-endothelial interactions, which plays the important role in triggering of the inflammation cascade. This is found appropriate to use of pharmacological agents with anti-inflammatory, antioxidant and membrane stabilizing properties. In this study we used a model of chronic venous insufficiency by partial occlusion of the inferior vena cava in rats. On this model has been created a stable hypertension, as well as significantly increased activity of leukocyte adhesion. Course (14 days) intragastrically of administration of the dihydroquercetin and arabinogalactan composition restored values of activity like in the sham-operated group.

Keywords: adhesive activity of leukocytes, chronic venous insufficiency, dihydroquercetin, arabinogalactan

Хроническая венозная недостаточность (ХВН) является самым распространенным заболеванием вен, которое сопровождается такими симптомами, как отеки, судороги, ощущение тяжести, покалывания и скованность ног, а также на поздних стадиях пигментацией кожи и трофическими язвами [5]. Все это в значительной степени снижает качество жизни больных, приводит к снижению трудовой и социальной активности [9].

Одним из патологических проявлений ХВН является чрезмерная активация лейкоцитов, их адгезия к эндотелию сосудов и миграция в периваскулярное пространство. Активное высвобождение лейкоцитами ряда веществ приводит к повреждению эндотелия, развитию воспалительного процесса в тканях и привлечению новых лейкоцитов, что ведет к прогрессированию патологии [4]. В недавнем исследовании показана роль лейкоцитов в повреждении венозных клапанов и липодерматосклерозе [3].

Как известно, в фармакотерапии ХВН широко применяются флавоноиды и другие вещества, обладающие противовос-

палительными, антиоксидантными, мембраностабилизирующими свойствами [12]. Перспективным веществом, с этой точки зрения, является дигидрокверцетин (ДГК). В недавних экспериментах было показано, что при внутривенном введении ДГК способен снижать миграцию лейкоцитов в поврежденные ткани при моделировании ишемии головного мозга [15]. Вместе с тем известно, что использование ДГК в сочетании с арабиногалактаном (АГ) повышает его фармакологическую активность [1].

Целью данной работы стала оценка влияния композиции дигидрокверцетина и арабиногалактана на адгезию лейкоцитов в условиях модели хронической венозной недостаточности.

Материалы и методы исследования

В работе использовали композицию, содержащую дигидрокверцетин и арабиногалактан в соотношении 1:5 (содержание ДГК и АГ 14,9 и 80,1% соответственно). Субстанция для исследования предоставлена ЗАО «Аметис».

Эксперименты выполнены на 17 аутбредных крысах-самцах сток Вистар массой 300–350 г. Животные содержались в стандартных условиях

ввария с 12/12 световым циклом и свободным доступом к воде и пище. Перед началом исследования было получено одобрение от Биоэтического комитета ФГБУ «НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга» СО РАМН.

Хроническую венозную недостаточность у крыс моделировали путем ограничения кровотока в нижней полой вене. Для этого у животных под эфирным наркозом проводили лапаротомию, выделяли участок нижней полой вены проксимальнее правой почечной вены и подводили под него лигатуру. После чего в бедренную вену вводили гепарин в дозе 250 ед./кг и осуществляли частичную окклюзию нижней полой вены (на 2/3) при помощи иглы с диаметром сечения 0,8 мм, которую прикладывали к вене в месте лигирования. После перевязки сосуда частично восстанавливали его просвет, извлекая иглу. У ложноперированных животных полностью повторяли оперативное вмешательство, но без этапа окклюзии сосуда.

Композицию дигидрокверцетина и арабиногалактана вводили животным опытной группы ($n = 6$) внутривенно ежедневно в дозе 300 мг/кг (50 мг ДГК и 250 мг АГ) в виде взвеси в воде очищенной. Животные контрольной ($n = 6$) и ложноперированной ($n = 5$) групп получали воду очищенную в эквивалентном количестве. Последнее введение веществ осуществляли за час до измерения параметров.

Измерение давления в полой вене проводили на 14-й день эксперимента. Перед измерением давления крыс наркотизировали диэтиловым эфиром, затем внутривенно вводили гепарин в дозе 250 ед./кг. Давление в нижней полой вене измеряли с помощью датчика TSD104A аппаратного комплекса «Віорас» (Віорас system, США). Доступ осуществляли через бедренную вену.

Для оценки адгезионной активности лейкоцитов пробы крови забирали у крыс из общей сонной артерии под эфирным наркозом. Фракцию лейкоцитов получали на градиенте плотности фиколл-верографина при центрифугировании. Для этого 4 мл цельной крови наслаивали на 1 мл смеси фиколла и верографина (7:16), после чего центрифугировали при 800 г в течение 25 мин. Полученное кольцо лейкоцитов собирали пипеткой и дважды отмывали в растворе Хэнкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} (0,8% NaCl, 0,04% KCl, 0,035% NaHCO_3 , 0,006% Na_2HPO_4 , 0,006% KH_2PO_4 , 0,1% глюкоза, pH = 7,4) при 400g в течение 15 мин. После этого осадок ресуспендировали в 5 мл раствора Хэнкса без Ca^{2+} и Mg^{2+} . Полученную суспензию лейкоцитов помещали в капилляр, предварительно обработанный раствором Дюльбекко (0,8% NaCl, 0,013% $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01% $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 0,02% KCl, 0,02% NaHPO_4 , 0,115% NaH_2PO_4 , pH = 7,4). Клетки инкубировали при 37 °C в течение 60 мин. Неадгезировавшие лейкоциты удаляли, поворачивая капилляр в вертикальное положение. После чего капилляр заполняли раствором Дюльбекко и при напряжении сдвига, создаваемом давлением 0,05 кгс/см², удаляли со стенок капилляра адгезировавшие лейкоциты. Число клеток подсчитали в исходной суспензии, а также в первом и втором смыве, используя камеру Горяева. Количество клеток в смывах выражали в процентах от числа лейкоцитов в исходной суспензии.

Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали непараметрический критерий Mann – Whitney U test. Результаты исследований представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m –

стандартная ошибка среднего значения. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистических программ «Statistica 6.0».

Результаты исследования и их обсуждение

У животных контрольной группы частичная окклюзия нижней полой вены приводила к развитию устойчивой гипертензии, что выражалось в повышении давления в 2,2 раза ($p < 0,01$) по сравнению с ложноперированной группой (табл. 1). Вместе с тем в группе животных, получавших композицию ДГК и АГ, давление было достоверно ниже на 16% по сравнению с контрольной группой.

Таблица 1

Давление в нижней полой вене у крыс на 14 день после ее частичной окклюзии

| Группы животных | Венозное давление, мм рт.ст. |
|--|------------------------------|
| Ложноперированные ($n = 5$) | 4,52 ± 0,18 |
| Контроль ($n = 6$) | 9,74 ± 0,33* |
| Дигидрокверцетин и арабиногалактан ($n = 6$) | 8,14 ± 0,32*+ |

Примечание. * – достоверно по сравнению с ложноперированными животными ($p < 0,05$); + – достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Из данных литературы известно, что используемая нами модель ХВН у животных характеризуется развитием стойкой, хотя и относительно умеренной, венозной гипертензии, которая, однако, провоцирует миграцию лейкоцитов в ткани [7]. При этом предварительная инъекция антител к белку ICAM-1 сильно ограничивает повышение уровня лейкоцитов [8].

В результате измерения адгезионной активности лейкоцитов было выявлено, что моделирование ХВН у крыс приводило к достоверному уменьшению доли неадгезировавших лейкоцитов в 2,6 раза и увеличению доли адгезировавших лейкоцитов в 1,7 раз по сравнению с ложноперированной группой (табл. 2).

В опытной группе животных применение композиции дигидрокверцетина и арабиногалактана ограничивало повышение адгезионной активности лейкоцитов (табл. 2). Доли неадгезировавших и адгезировавших лейкоцитов были близки к значениям в ложноперированной группе, причем доля последних значимо отличалась от контроля.

Таблица 2

Влияние композиции дигидрокверцетина и арабиногалактана на адгезию лейкоцитов в условиях ХВН у крыс

| Группа животных | Неадгезировавшие лейкоциты, % | Адгезировавшие лейкоциты, % |
|---|-------------------------------|-----------------------------|
| Ложнооперированные, $n = 5$ | $39,0 \pm 4,0$ | $48,6 \pm 4,7$ |
| Контроль, $n = 6$ | $16,5 \pm 4,9^*$ | $80,5 \pm 8,3^*$ |
| Дигидрокверцетин и арабиногалактан, $n = 6$ | $31,3 \pm 5,0$ | $50,8 \pm 7,0^+$ |

Примечание. * – достоверно по сравнению с ложнооперированными животными ($p < 0,05$); + – достоверно по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

В соответствии с гипотезой лейкоцитарной активации при ХВН наблюдается усиление «прилипания» белых клеток крови к эндотелию сосудов, что объясняется снижением скорости кровотока и повышением экспрессии молекул адгезии, включая ICAM-1 и VCAM-1, эндотелиоцитами [2, 13]. Причем изменения в уровне молекул адгезии и лейкоцитарная инфильтрация тканей ног развиваются даже у здоровых людей в ответ на естественное повышение давления в венах, вызванное длительным нахождением в положении стоя [11]. Поэтому важным является не только уровень конкретного белка, но, в большей мере, баланс между воспалительными реакциями и защитными механизмами.

Как известно, флавоноиды, в том числе ДГК, способны оказывать противовоспалительное действие, ингибируя ферменты, вовлеченные в этот процесс [6, 12]. ДГК является ингибитором фосфодиэстеразы 4 типа, локализованной в различных клетках, в том числе и в лейкоцитах [15]. Благодаря своим сильным антиоксидантным свойствам ДГК способен защищать ткани от свободных радикалов, активно продуцируемых лейкоцитами, что, в свою очередь, препятствует привлечению новых клеток [2]. Прямое действие ДГК может быть обусловлено его способностью снижать экспрессию молекул адгезии ICAM-1 в кератиноцитах и Mac-1-индуцированную адгезию нейтрофилов из периферической крови человека [2, 4]. Кроме того, на модели ишемии головного мозга было обнаружено, что применение ДГК ограничивало инфильтрацию лейкоцитов и вызванное этим повреждение тканей [1].

Выводы

Таким образом, на модели ХВН, вызванной частичной окклюзией нижней полой вены крыс, было показано выраженное повышение адгезионной активности лейкоцитов. Курсовой внутривенный прием композиции дигидрокверцетина и арабино-

галактана (50 и 250 мг/кг соответственно) восстанавливал адгезионную активность лейкоцитов до показателей ложнооперированных животных.

Список литературы

1. Патент РФ № 2421215, 15.04.2010.
2. Bergan J.J. Chronic Venous Disease // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol. 355, № 5. – P. 488–498.
3. Bergan J.J. Molecular mechanisms in chronic venous insufficiency // *Ann. Vasc. Surg.* – 2007. – Vol. 21. – P. 260–266.
4. Bito T. Flavonoids differentially regulate IFN γ -induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action // *FEBS Letters.* – 2002. – Vol. 520. – P. 145–152.
5. Boisseau M.R., de La Giçlais B. Chronic venous diseases: roles of various pathophysiological factors // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2004. – Vol. 31, № 1. – P. 67–74.
6. Gupta M.B. Anti-inflammatory activity of taxofolin // *Japan J. Pharmacol.* – 1971. – Vol. 21, № 3. – P. 377–382.
7. Hahn T.L., Unthank J.L., Lalka S.G. Increased hindlimb leukocyte concentration in a chronic rodent model of venous hypertension // *J. Surg. Res.* – 1999. – Vol. 81. – P. 38–41.
8. Hahn T.L. Evaluation of the role of intercellular adhesion molecule 1 in a rodent model of chronic venous hypertension // *J. Surg. Res.* – 2000. – Vol. 88, № 2. – P. 150–154.
9. Kaplan R.M. Quality of life in patients with chronic venous disease: San Diego population study // *J. Vasc. Surg.* – 2003. – Vol. 35, № 5. – P. 1047–1053.
10. Ojdana D. The inflammatory reaction during chronic venous disease of lower limbs // *Folia Histochem. Cytobiol.* – 2009. – Vol. 47, № 2. – P. 185–189.
11. Saharay M. Endothelial activation in patients with chronic venous disease // *Eur. J. Vasc Endovasc. Surg.* – 1998. – Vol. 15, № 4. – P. 342–349.
12. Sandra Marinović Kulišić, Dinko Lupi. Pharmacological treatment in patients with chronic venous disease // *Acta. Dermatovenerol. Croat.* – 2012. – Vol. 20, № 3. – P. 197–200.
13. Takase S. Leukocyte activation in patients with venous insufficiency // *J. Vasc. Surg.* – 1999. – Vol. 30, № 1. – P. 148–156.
14. Wang Y.H. 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, № 12. – P. 2251–2262.
15. Wang Y.H. Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation // *J. Biomed. Sci.* – 2006. – Vol. 13, № 1. – P. 127–141.

References

1. Patent RF № 2421215, 15.04.2010.
2. Bergan J.J. Chronic Venous Disease // *N. Engl. J. Med.* 2006. Vol. 355. no. 5. pp. 488–498.
3. Bergan J.J. Molecular mechanisms in chronic venous insufficiency // *Ann. Vasc. Surg.* 2007. Vol. 21. pp. 260–266.
4. Bito T. Flavonoids differentially regulate IFN γ -induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action // *FEBS Letters.* 2002. Vol. 520. pp. 145–152.
5. Boisseau M.R., de La Giçlais B. Chronic venous diseases: roles of various pathophysiological factors // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2004. Vol. 31. no. 1. pp. 67–74.
6. Gupta M.B. Anti-inflammatory activity of taxofolin // *Japan J. Pharmacol.* 1971. Vol. 21. no. 3. pp. 377–382.
7. Hahn T.L., Unthank J.L., Lalka S.G. Increased hindlimb leukocyte concentration in a chronic rodent model of venous hypertension // *J. Surg. Res.* 1999. Vol. 81. pp. 38–41.
8. Hahn T.L. Evaluation of the role of intercellular adhesion molecule 1 in a rodent model of chronic venous hypertension // *J. Surg. Res.* 2000. Vol. 88. no. 2. pp. 150–154.
9. Kaplan R.M. Quality of life in patients with chronic venous disease: San Diego population study // *J. Vasc. Surg.* 2003. Vol. 35. no. 5. pp. 1047–1053.
10. Ojdana D. The inflammatory reaction during chronic venous disease of lower limbs // *Folia Histochem. Cytobiol.* 2009. Vol. 47. no. 2. pp. 185–189.
11. Saharay M. Endothelial activation in patients with chronic venous disease // *Eur. J. Vasc Endovasc. Surg.* 1998. Vol. 15. no. 4. pp. 342–349.
12. Sandra Marinović Kulišić, Dinko Lupi. Pharmacological treatment in patients with chronic venous disease // *Acta. Dermatovenerol. Croat.* 2012. Vol. 20. no. 3. pp. 197–200.
13. Takase S. Leukocyte activation in patients with venous insufficiency // *J. Vasc. Surg.* 1999. Vol. 30. no. 1. pp. 148–156.
14. Wang Y.H. 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. pp. 2251–2262.
15. Wang Y.H. Taxifolin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-oxidative effect and modulation of NF-kappa B activation // *J. Biomed. Sci.* 2006. Vol. 13. no. 1. pp. 127–141.

Рецензенты:

Плотникова Т.М., д.б.н., профессор кафедры фармакологии, ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Томск;

Суслов Н.И., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией психофармакологии, ФГБУ «НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга» СО РАМН, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 04.06.2014.