



УДК 616.132; 615.252

## ЗАСТОСУВАННЯ ЛІПОФЛАВОНУ® ДЛЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

**К. І. Клименко, О. В. Паршиков, А. І. Соловйов**

*Державна установа «Інститут фармакології та токсикології  
Національної академії медичних наук України»  
вул. Ежена Потье, 14, Київ 03680, Україна  
e-mail: Kate\_Klimenko@bigmir.net*

Відомо, що у розвитку серцево-судинних ускладнень за цукрового діабету значну роль відіграє порушення функціонування ендотелію. До того ж на сьогодні патофізіологічний зв'язок між високою концентрацією глюкози та судинною дисфункцією все ще має багато невизначеностей. Тому в роботі було досліджено ендотеліозалежну дилатацію кільцевих сегментів аорти здорових щурів за умов гіперглікемії та діабетичних до та після впливу кверцетинвмісних фосфатидилхолінових ліпосом (препарат Ліпофлавіон®) у разі застосування як *in vitro*, так і *in vivo*. Реєстрацію змін судинного тонуусу здійснювали в ізометричному режимі. Усі дані представлено у вигляді середнього арифметичного ( $M$ ) і стандартної похибки середнього арифметичного ( $m$ ) для певної вибірки ( $n$ ). У день дослідження діабетичні тварини (стрептозотоцин, 65 мг/кг) демонстрували в 4 рази вищий рівень глюкози у крові, ніж контрольна група, а також знижені дилататорні реакції на ацетилхолін (АХ, 1 нМ–10 мкМ) попередньо скорочених норадреналіном (НА, 1 мкМ) ізольованих сегментів аорти. Інкубація за умов гіперглікемії (25 мМ/л глюкози) призводила до залежного від тривалості інкубації (4 або 6 год) зниження дилатації порівняно із нормоглікемічними (5,5 мМ/л) умовами. Аплікація Ліпофлавіону® (3 мкг/мл за кверцетином) до камери зі скороченими НА судинними сегментами аорти діабетичних щурів призвела до зниження їх тонічного напруження. Після цього судинні препарати демонстрували зростання дилатації на АХ порівняно із діабетичними судинами без аплікації Ліпофлавіону®. Внутрішньовенне введення Ліпофлавіону® в обох концентраціях (15 мг/кг або 50 мг/кг у перерахунку на лецитин-стандарт або 0,4 мг/кг і 1,4 мг/кг у перерахунку на кверцетин) призводило до відновлення дилататорних реакцій до контрольного рівня. Отримані дані підтверджують, що гіперглікемія є одним із основних факторів, які призводять до порушення ендотеліозалежної дилатації судин. Препарат Ліпофлавіон® справляє відновлювальний ефект на пригнічену ендотеліозалежну дилатацію ізольованих судинних сегментів щурів із експериментальним діабетом. Тому можна стверджувати, що даний препарат має значні перспективи у лікуванні діабетичних ангіопатій.

**Ключові слова:** судинні ускладнення цукрового діабету, ендотеліальна дисфункція, кверцетин, Ліпофлавіон®.

## ВСТУП

Цукровий діабет є важливою медико-соціальною проблемою. Серед численних факторів розвитку судинних ускладнень, які є основними причинами смертності у пацієнтів як із I, так і з II типом цукрового діабету, порушення регуляторної функції ендотелію, поряд із розвитком оксидативного стресу, є одним із найвагоміших.

Дисфункція судинного ендотелію є важливим фактором у патогенезі діабетичних мікро- та макроангіопатій [32]. Проте остаточно невідомо, чи порушення функціонування ендотелію викликане лише гіперглікемією, чи й іншими факторами.

Ендотеліальні клітини відіграють основну роль у підтримуванні серцево-судинного гомеостазу та функціонуванні судинної стінки. Окрім створення фізичного бар'єра між судинною стінкою та просвітом, ендотелій секретує численні медіатори, які регулюють агрегацію тромбоцитів, процеси коагуляції, фібриноліз і безпосередньо судинний тонус. Ендотеліальні клітини секретують медіатори, які опосередковують як вазоконстрикцію (такі як ендотелін-1, тромбоксан A2), так і вазодилатацію (оксид азоту NO, простагліцилін, ендотелійзалежний гіперполяризуючий фактор ЕЗГФ) [5]. Існують дані, що рівень відносного вкладу NO та ЕЗГФ у процес дилатації судин різниться від типу судинного русла та фізіологічних або патологічних умов [24].

Чимало факторів призводять до ускладнень з боку ССС за умов діабету: це гіперглікемія, індивідуальні особливості, гіпертензія, гіперліпідемія, ожиріння, шкідливі звички та ін. На сьогоднішній день лідером серед цих факторів вважається хронічна гіперглікемія, хоча патофізіологічний зв'язок між високою концентрацією глюкози та судинною дисфункцією все ще є приводом для дискусії та має багато невизначеностей [20, 43]. Так, глікемічний контроль може затримати розвиток і загальмувати прогрес судинних ускладнень цукрового діабету [38], проте ця стратегія не є успішною для всіх пацієнтів.

Є дані, що самої лише гіперглікемії може бути недостатньо для виникнення діабетичних змін [15], до того ж деякі роботи демонструють, що лише у 30–40% пацієнтів із діабетом 1 типу розвивається хронічна ниркова недостатність, що свідчить про значну роль генетичних і захисних тканинних факторів [20].

Окрім того, чимало пацієнтів живуть більше 50 років із цукровим діабетом і не мають гострих ускладнень з боку ССС, хоча й наявні всі фактори для їхнього розвитку [20]. Тому проблема пошуку новітніх підходів і альтернативних методів запобігання та фармакологічної корекції судинних ускладнень за умов цукрового діабету залишається відкритою.

На сьогоднішній день є ціла низка досліджень, що демонструють позитивний вплив біофлавоноїдів на серцево-судинну систему. Кверцетин є одним із найбільш вивчених біофлавоноїдів, до того ж доведений його відновлювальний ефект на функціонування судинної стінки за умов цукрового діабету [4, 21, 33]. Окрім того, є чимало даних про позитивні впливи на функціонування судинної стінки як порожніх фосфатидилхолінових ліпосом [3], так і ліпосомальної форми кверцетину [14]. Саме тому ми вирішили використати кверцетинвмісні фосфатидилхолінові ліпосоми за умов оксидативного стресу на фоні експериментального діабету.

Виходячи з вищенаведеного, метою нашої роботи стало дослідити ендотелійзалежну дилатацію ізольованих судинних сегментів здорових щурів при інкубації в умовах гіперглікемії; дослідити дилатацію судинних сегментів щурів зі стрептозоточиніндукованим експериментальним діабетом і вплив на неї кверцетинвмісних фосфатидилхолінових ліпосом (препарат Ліпофлавіон®) при застосуванні як *in vitro*, так і *in vivo*.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Індукція діабету.** Дослідження проводили на самцях щурів лінії Wistar (180–200 г). Діабет був індукований одноразовою внутрішньоочеревинною ін'єкцією стрептозотоцину (STZ) у концентрації 60–65 мг/кг. Визначення експериментального діабету проводили за наявністю гіперглікемії. Концентрацію глюкози у плазмі крові вимірювали через 1 місяць після ін'єкції STZ і в день експерименту в усіх груп досліджуваних тварин. STZ розчиняли в цитратному буферному розчині, який містив 0,9% NaCl та 10 мМ цитрату, pH=4,6. Концентрацію глюкози визначали, застосовуючи глюкозомер Bionime (BIONIME Rightest GM 300, Швейцарія).

Кверцетинвмісні фосфатидилхолінові ліпосоми застосовували у вигляді препарату Ліпофлавор® («Биолек», Харків) такого складу: лецитин-стандарт 550 мг, кверцетин 15 мг, лактоза 320 мг.

Дослідних тварин було поділено на 4 групи: контрольні, тварини із STZ-індукованим діабетом і діабетичні тварини, яким вводили Ліпофлавор® у дозі 15 мг/кг та 50 мг/кг у перерахунку на лецитин-стандарт або 0,4 мг/кг та 1,4 мг/кг відповідно, у перерахунку на діючу речовину кверцетин. Ліпофлавор® вводили внутрішньовенно дворазово на 45 і 47 день після ін'єкції STZ. Тварин брали у дослід на 10–13 день після першого введення Ліпофлавору®. Усі досліди проводили відповідно до вимог Європейської конвенції захисту тварин, що використовуються в експериментальних та інших цілях, і були ухвалені комітетом з біоетики інституту.

**Об'єкт дослідження.** Об'єктом досліджень були ізольовані кільцеві сегменти грудної аорти щурів. Після попередньої анестезії (кетамін 45 мг/кг, ксилазин 10 мг/кг) тварини були евтаназовані шляхом декапітації із подальшим знекровленням. Після цього грудна аорта була виділена і одразу перенесена у розчин Кребса такого складу (у ммоль/л): NaCl 133; NaHCO<sub>3</sub> 16,3; KCl 4,7; MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O 1,05; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,38; CaCl<sub>2</sub> 2,75; глюкоза 11,5; HEPES 10 (pH=7,4) кімнатної температури. Одночасно проводили забір крові на визначення рівня глюкози.

Грудну аорту за допомогою препарувальних голок фіксували на парафіновому дні препарувальної чашки, заповненої розчином Кребса та під бінокулярним збільшенням від сполучної тканини і згустків крові. Відпрепаровану ділянку грудної аорти нарізали на кільцеві сегменти шириною 1–2 мм і внутрішнім діаметром 1,5–2 мм, під кутом близько 45°, оскільки стінка цих судин складається переважно з кільцевих м'язових шарів, які мають кутову орієнтацію. Отримані судинні препарати залишали у розчині Кребса за кімнатної температури на 45–60 хв.

**Реєстрація скоротливої активності.** Реєстрація скоротливої активності ізольованих судинних препаратів здійснювалась в ізометричному режимі за допомогою емнісних датчиків напруження.

Судинні сегменти розміщували у робочій плексигласовій камері об'ємом 0,5 мл із проточним буферним розчином, де закріплювали на двох сталевих гачках, один із яких був стаціонарно вмонтований до стінки камери, а інший поєднаний із штоком тензодатчика. Для отримання оптимальної сили скорочення судинні сегменти підлягали попередньому пасивному розтягненню зі силою 1 300–1 400 мГ.

Судинні сегменти в камері перфузувались буферним розчином зі сталою швидкістю 1,5 мл/хв за допомогою 4-канального перистальтичного насоса IPS ISM 930 "Ismatec" (Німеччина) за температури 37°C. Для визначення ендотеліязалежної вазодилатації застосовували аплікацію ацетилхоліну (AX) у концентрації 1 нМ–10 мкМ

на попередньо скорочені норадреналіном (НА,  $10^{-6}$  М) судинні препарати. Аплікацію усіх застосованих фармакологічних агентів здійснювали за допомогою перфузійної системи.

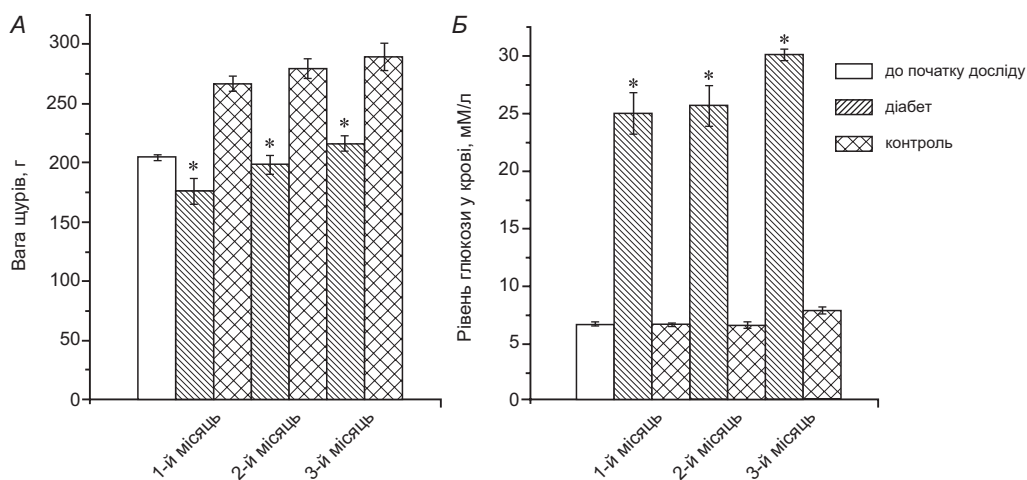
**Інкубація судинних препаратів.** Судинні сегменти інкубувалися в розчині Кребса вищезазначеного складу із концентрацією глюкози 5,5 мМ для інкубації в умовах нормоглікемії та 25 мМ для інкубації в умовах гіперглікемії, pH=7,4. Протягом усього часу інкубації (4 або 6 год) підтримувалася стала концентрація  $\text{CO}_2$  і температура  $37^\circ\text{C}$ . Після інкубації проводили реєстрацію скоротливої активності.

**Статистична обробка результатів.** Усі дані представлено у вигляді середнього арифметичного (М) та стандартної похибки середнього арифметичного (m) для певної вибірки (n). Статистичну обробку результатів здійснювали за *t*-критерієм Стьюдента; дані вважали статистично достовірними при  $P < 0,05$ .

Величини середньої ефективної концентрації АХ були виражені як від'ємний логарифм концентрації ( $\text{EC}_{50}$ ). Усі розрахунки проводили з використанням комп'ютерних програм EXEL 5.0 та OriginPro 7.5 (Microcal Software Inc.).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Через місяць після введення STZ і наступні 3 місяці тварини демонстрували чіткі прояви діабету: зростання рівня глюкози у крові (гіперглікемія), підвищення споживання води та зниження ваги тіла – ознаки, за якими визначають STZ-діабет у щурів [40] (рис. 1).



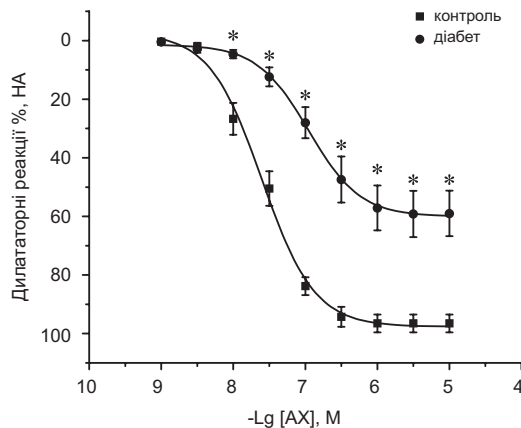
**Рис. 1.** Показники ваги (А) та рівня глюкози у крові (Б) щурів здорової групи та групи із експериментальним діабетом протягом трьох місяців. \* –  $P < 0,05$

**Fig. 1.** Weight (A) and blood glucose level (B) in healthy and diabetic rats within three month observation. \* –  $P < 0.05$

У день дослідження рівень глюкози у крові діабетичних тварин був достовірно вищим ніж у контрольної групи ( $7,1 \pm 1,4$  мМ/л,  $n=6$ ), і становив  $30,7 \pm 0,9$  мМ/л ( $n=11$ ;  $P < 0,05$ ).

У наступній серії експериментів було досліджено ендотеліязалежні дилататорні реакції кільцевих судинних сегментів грудної аорти здорових та щурів із STZ-індукованим діабетом. Ацетилхолін (АХ) у концентрації 1 нМ–10 мкМ викликав дозозалежну дилатацію попередньо скорочених норадреналіном (НА, 1 мкМ) препаратів аорти контрольної групи щурів із максимумом розслаблення ( $96,5 \pm 3,05\%$ ,  $n=7$ ). У той час як

судини щурів із цукровим діабетом демонстрували пригнічену ендотелійзалежну вазодилатацію з максимумом  $58,98 \pm 7,75\%$  ( $n=11$ ;  $P < 0,05$ ) від тонічного напруження, створеного дією АХ (рис. 2). Середня ефективна концентрація, що виражена як від'ємний логарифм ( $EC_{50}$ ) для АХ, становила в контролі  $7,59 \pm 0,08$  ( $n=7$ ), при цьому для діабетичних судинних сегментів спостерігався зсув у чутливості до АХ із  $EC_{50}$   $6,97 \pm 0,1$  ( $n=11$ ;  $P < 0,05$ ).



**Рис. 2.** Ендотелійзалежні дилататорні реакції аорти здорових щурів та щурів із експериментальним діабетом. \* –  $P < 0,05$

**Fig. 2.** Acetylcholine-induced endothelium-dependent dilation of vascular segments obtained from healthy and diabetic rats. \* –  $P < 0,05$

Отримані результати підтверджують дані інших дослідників, які вказують на те, що порушення функціонування ендотелію відіграє одну з ключових ролей у патогенезі розвитку судинних ускладнень цукрового діабету як I, так і II типу у різних видів тварин (щурів, собак, кролів) у різних судинних руслах як на хімічно-індукованих, так і на генетичних моделях діабету [11], а також у пацієнтів із цукровим діабетом [8].

Гіперглікемія як основний фактор розвитку порушень при цукровому діабеті може призводити до порушення функціонування ендотелію за рахунок збільшення продукції реактивних форм кисню (РФК, унаслідок аутоокислення глюкози та ін.) та розвитку оксидативного стресу, формування кінцевих продуктів глікозилювання, порушення метаболізму арахідонової кислоти [42], зростання активації ПКС та зниження експресії та/або активності eNOS-синтази [6]. Проте деякі роботи свідчать, навпаки, про зростання генної та білкової експресії eNOS і подальшого зростання продукції NO до 40% [10]. Надлишок NO надалі дуже швидко може взаємодіяти із надмірною кількістю супероксиду з утворенням іншого потужного оксиданта – пероксинітриду [2, 34].

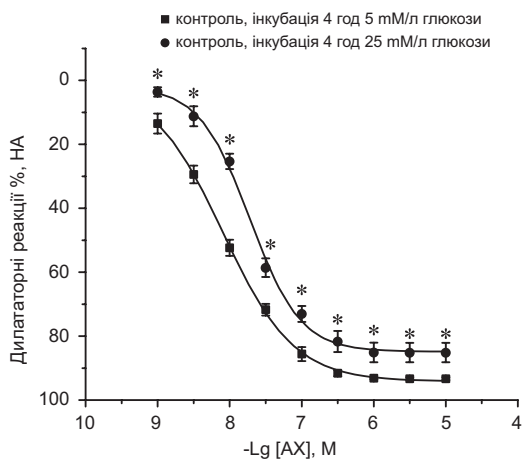
Наступним етапом нашої роботи стало визначення впливу зростаючих концентрацій глюкози на ендотелійзалежну дилатацію ізольованих судинних сегментів грудної аорти здорових щурів.

Судини, інкубовані у розчині Кребса із нормальною концентрацією глюкози (5,5 мМ), демонстрували високі рівні дилатації на АХ із максимумом  $93,3 \pm 0,45\%$  ( $EC_{50}$   $8,1 \pm 0,001$ ,  $n=6$ ), тоді як судинні сегменти, що були інкубовані протягом 4-х годин в умовах гіперглікемії (25 мМ), демонстрували максимум дилатації  $85,1 \pm 3,03\%$  ( $EC_{50}$   $7,7 \pm 0,04$ ,  $n=8$ ) (рис. 3).

Збільшення періоду інкубації до 6-ти годин призвело до більших відмінностей у дилататорних реакціях судин. Судинні сегменти, інкубовані в розчині Кребса із 25 мМ глюкози протягом 6 годин, демонстрували пригнічену ендотелійзалежну вазодилатацію з максимумом  $79,56 \pm 4,16\%$  ( $EC_{50}$   $7,171 \pm 0,11$ ,  $n=5$ ;  $P < 0,05$ ) від тонусу,

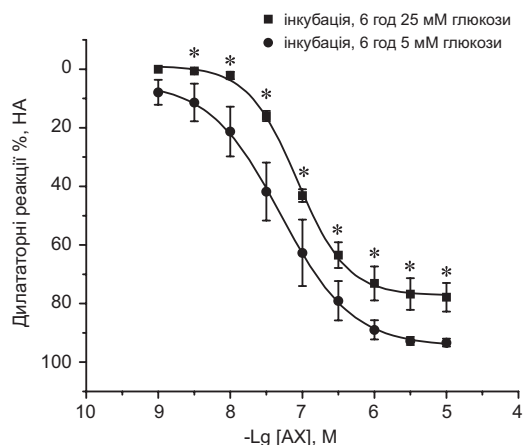
створеного дією НА, порівняно зі судинами, інкубованими за нормальної концентрації глюкози ( $93,33 \pm 1,34\%$ , ( $EC_{50} 7,358 \pm 0,24$ ,  $n=6$ ) (рис. 4).

Проведені дослідження демонструють, що нетривала експозиція судинних сегментів грудної аорти щурів у високій концентрації глюкози в навколишньому розчині пригнічує ендотелійзалежну вазодилатацію. Це пригнічення може бути викликане/опосередковане зростанням рівня оксидативного стресу. Як стверджують деякі роботи, короткотривала (до 24 год) експозиція високого рівня глюкози (25 мМ) стимулює продукцію супероксиданіона ( $CO_2^-$ ) у дрібних коронарних артеріях щурів і викликає пригнічення потенціалозалежного  $K^+$ -струму [25].



**Рис.3.** Ендотелійзалежні дилаторні реакції аорти здорових щурів після інкубації у розчині Кребса із різною концентрацією глюкози (5 та 25 мМ/л) протягом 4-х годин. \* –  $P < 0,05$

**Fig. 3.** Endothelium-dependent dilation of vascular segments obtained from healthy rats and incubated in hyperglycemic (25 mM/L glucose) and normoglycemic (5.5 mM/L glucose) solution within 4 hours. \* –  $P < 0.05$



**Рис.4.** Ендотелійзалежні дилаторні реакції аорти здорових щурів після інкубації у розчині Кребса із різною концентрацією глюкози (5 та 25 мМ/л) протягом 6-ти годин. \* –  $P < 0,05$

**Fig. 4.** Endothelium-dependent dilation of vascular segments obtained from healthy rats and incubated in hyperglycemic (25 mM/L glucose) and normoglycemic (5.5 mM/L glucose) solution within 6 hours. \* –  $P < 0.05$

Отримані нами результати підтверджують, що гіперглікемія призводить до порушення ендотелійзалежної вазодилатації і може бути одним із основних факторів розвитку діабетичних ангіопатій.

Надпродукція РФК є спільною рисою всіх клітин, що зазнають ушкоджень за умов гіперглікемії [30]. Розвиток оксидативного стресу за цукрового діабету може бути наслідком зростання продукції оксидантів (глюкоксидантів, окиснених ліпопротеїнів низької щільності (ЛНЩ), глікозильованих продуктів, супероксиду, нітритрози, як було показано на культурі клітин судин [18]; ізопростанів, 8-гідроксидеооксигуанозину,



ліпідних пероксидів у тварин і пацієнтів із діабетом [19]; зниження активності антиоксидантних захисних механізмів (таких як супероксиддисмутаза, вітамін Е,  $\alpha$ -ліпоева кислота [13] або і того, й іншого [36, 41].

Ще одним механізмом може бути порушення функціонування  $K^+$ -каналів плазматичної мембрани ГМК. Відомо, що за умов діабету спостерігається зниження вихідного  $K^+$ -струму в результаті пригнічуючого впливу ПКС, РФК та ін. на функціонування каналів [26]. Це призводить до порушення процесу гіперполяризації плазматичної мембрани ГМК та, відповідно, дилатації судин.

Роботи з даної тематики показують, що до зниження ендотеліязалежної дилатації судинних сегментів може призводити інкубація протягом 1 години за концентрації 300, 500 мг D-глюкози на 100 мл, хоча концентрація 200 мг/100 мл не демонструвала такого ефекту. До того ж не спостерігалось змін у дилаторних реакціях у відповідь на нітропрурид, що свідчить про те, що висока концентрація глюкози у навколишньому розчині впливає саме на ендотеліязалежні реакції [7].

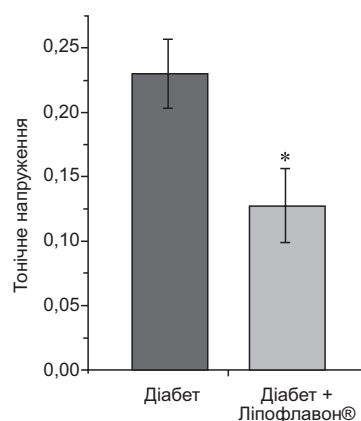
За інкубації протягом 6 год і концентрації глюкози 44 мМ спостерігається значне зниження ендотеліязалежної дилатації аорти кролів [37].

Цікаво, що у досліджах із реєстрацією ендотеліязалежної вазодилатації після експозиції високої концентрації глюкози простежується статева відмінність. Так, інкубація протягом 3 год за високої концентрації глюкози (44 мМ) призводила до зниження ендотеліязалежної дилатації сегментів грудної аорти самиць щурів, у той час як реакції сегментів грудної аорти самців не демонстрували відмінностей від реакцій сегментів, інкубованих за нормальної концентрації глюкози [16]. Хоча збільшення часу інкубації до 6 год призводило до зниження ендотеліязалежної дилатації і у судинних сегментів грудної аорти самців [16, 39]. При цьому ендотеліязалежна вазодилатація (Na-нітропрурид, A23187) не зазнавала змін після 6 год інкубації за високих концентрацій глюкози (44 мМ, 50 мМ) сегментів аорти як щурів, так і мурчаків обох статей [12, 39].

Дослідження впливу Ліпофлакону® на функціонування судинної стінки за умов діабету було розпочато з аплікації даного фармакологічного препарату в концентрації 3 мкг/мл (за кверцетином) на скорочені НА ( $10^{-6}$  М) ізольовані судинні сегменти грудної аорти діабетичних щурів, що призвело до суттєвого зниження їх тонічного напруження з  $0,23 \pm 0,03$  г (n=6) до  $0,13 \pm 0,03$  г (n=6,  $P < 0,05$ ) (рис. 5).

Після цього судинні препарати демонстрували значне покращення дилатації на зростаючі концентрації АХ ( $10^{-9}$ – $10^{-5}$  М) із максимумом розслаблення  $90,54 \pm 9,46\%$  (n=6,  $EC_{50}$   $7,55 \pm 0,14$ ) порівняно з діабетичними судинами без аплікації Ліпофлакону®, де максимум розслаблення становив  $57,74 \pm 6,35\%$  (n=6,  $EC_{50}$   $6,89 \pm 0,2$ ) (рис. 6).

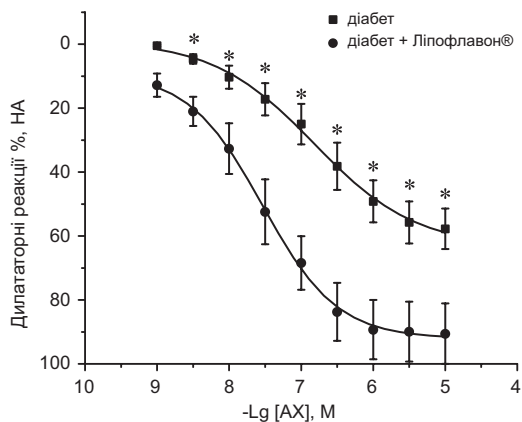
На наступному етапі експериментів нами було досліджено ефект різних концентрацій Ліпофлакону® на ендотеліязалежні дилаторні реакції ізольованих судинних сегментів щурів із експериментальним діабетом.



**Рис. 5.** Тонічне напруження скорочених НА ( $10^{-6}$  М) ізольованих судинних препаратів діабетичних щурів до та після аплікації Ліпофлакону® (3 мкг/мл за кверцетином). \* –  $P < 0,05$

**Fig. 5.** Vascular tension of precontracted (NA  $10^{-6}$  M) isolated vascular rings of diabetic rats before and after Lipoflavon® (3  $\mu$ g/mL quercetin) application. \* –  $P < 0.05$

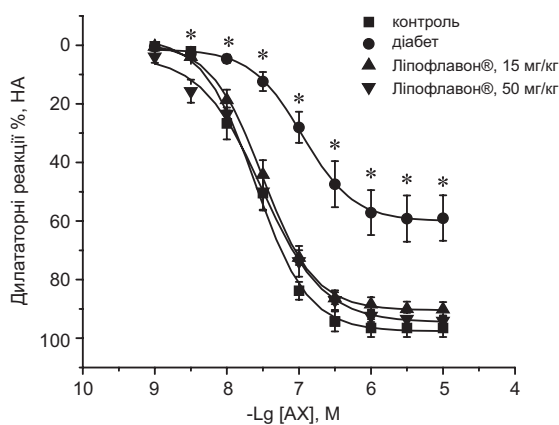
Внутрішньовенне введення Ліпофлавону® в концентрації 15 мг/кг (у перерахунку на лецитин-стандарт, або 0,4 мг/кг у перерахунку на діочу речовину кверцетин) призводило до відновлення дилататорних реакцій у відповідь на АХ до рівня, близького до контрольних значень ( $90,16 \pm 2,48$  %,  $n=16$ ;  $P < 0,05$ ) із  $EC_{50}$   $7,55 \pm 0,07$ .



**Рис 6.** Ендотелійзалежні дилататорні реакції аорти діабетичних щурів до та після аплікації Ліпофлавону® (3 мкг/кг за кверцетином). \* –  $P < 0,05$

**Fig. 6.** Endothelium-dependent dilation of aorta vascular segments obtained from diabetic rats before and after Lipoflavon® (3  $\mu$ g/mL quercetin) application. \* –  $P < 0.05$

Подібні результати було отримано і на судинах тварин, яким вводили Ліпофлавоно® у концентрації 50 мг/кг за лецитином (1,4 мг/кг за кверцетином), де максимум АХ-залежної дилатації становив  $94,1 \pm 1,89$ % ( $n=16$ ;  $P < 0,05$ ) та  $EC_{50}$  становила  $7,55 \pm 0,13$  (рис. 7). Тобто підвищення концентрації Ліпофлавону® не впливало на зростання ефекту на ендотелійзалежну дилатацію, хоча наші попередні роботи свідчать про дозозалежність ефектів Ліпофлавону® на сумарний вихідний  $K^+$ -струм ізольованих ГМК діабетичних щурів [1].



**Рис 7.** Ендотелійзалежні дилататорні реакції аорти діабетичних щурів після двократного внутрішньовенного введення Ліпофлавону® у концентрації 15 мг/кг та 50 мг/кг за лецитином порівняно з реакціями контрольних і щурів із цукровим діабетом. \* –  $P < 0,05$

**Fig. 7.** Endothelium-dependent dilation of aorta vascular segments obtained from healthy rats, diabetic rats and from diabetic rats after Lipoflavon® treatment (15 mg/kg and 50 mg/kg of phosphatidylcholine, intravenous injection). \* –  $P < 0.05$

Кверцетин є широковідомим антиоксидантом, для якого продемонстровані позитивні впливи на функціонування як організму в цілому, так і серцево-судинної системи зокрема (зниження артеріального тиску, зниження ліпопротеїнів низької щільності у плазмі крові, зниження агрегації тромбоцитів та формування тромбів) [21]. До покращення вазодилатації кверцетин може призводити, регулюючи функціонування як ендотеліальних клітин (ЕК), так і ГМК. Так в ЕК було продемонстроване пригнічення транскрипційних факторів NF- $\kappa$ B та AP-1 [28], які активуються РФК.



На рівні ГМК під впливом кверцетину спостерігається активація  $BK_{Ca}$ , яка може бути опосередкована як зв'язуванням кверцетину із естрогеновими рецепторами і подальшою стимуляцією каналів [17], так і за рахунок  $H_2O_2$ -залежних сигнальних шляхів, адже кверцетин може виступати і як прооксидант [9]. Спостерігається інгібування протеїнкіназ, таких як ПКС і кіназа легких ланцюгів міозину [29], пригнічення фосфоліпази A2 та супероксиддисмутазна активність [23].

Ґрунтовне дослідження ліпосом і створення ліпосомальних форм препаратів, зокрема антиоксидантів [35], частково розв'язало питання доставки фармакологічних препаратів. Окрім того, включення кверцетину в ліпосоми знижує його токсичність [31]. Є чимало даних про позитивні впливи на функціонування судинної стінки як порожніх фосфатидилхолінових ліпосом [3], так і ліпосомальної форми кверцетину, серед яких антиоксидантний ефект, відновлення функціональної активності ендотелію, інгібування ангіотензин-перетворюючого ферменту і протеїнкінази С (ПКС) [14, 22]. Відомо, що ПКС реалізує широкий спектр своєї дії саме за патологічних умов, зокрема, призводить до активації НАДФ-оксидаз із подальшою надпродукцією РФК і розвитком оксидативного стресу [27]. РФК, у свою чергу, можуть активувати різні ізоформи ПКС, що призводить до запуску цілого каскаду сигнальних шляхів [15].

## ВИСНОВКИ

Підсумовуючи отримані дані, можна стверджувати, що гіперглікемія є якщо не найголовнішим, то одним із основних факторів, який призводить до порушення ендотеліозалежної дилатації судин. Кверцетинвмісні фосфатидилхолінові ліпосоми у вигляді препарату Ліпофлавіон® справляють відновлювальний ефект на пригнічену ендотеліозалежну дилатацію ізольованих судинних сегментів щурів із експериментальним діабетом. Таким чином, хоча остаточний механізм, за яким ліпосомальний кверцетин сприяє покращенню вазодилатації, все ще залишається нез'ясованим, даний препарат має значні перспективи у лікування діабетичних ангіопатій.

1. *Клименко К.І., Новохацька Т.В., Кізуб І.В., Соловйов А.І.* Вплив Ліпофлавіону на сумарні вихідні  $K^+$ -струми в гладеньком'язових клітинах аорти щурів із цукровим діабетом. **Фармакологія та лікарська токсикологія**, 2012; 5(30): 31–36.
2. *Соловьев А.И., Стефанов А.В.* Фармакология и токсикология оксида азота: два "лица" одной и той же молекулы. **Современные проблемы токсикологии**, 1998; 1: 35–38.
3. *Хромов О.С., Добреля Н.В.* Експериментальне обґрунтування застосування фосфатидилхолінових ліпосом як нового гіпотензивного засобу. **Вісник Дніпропетр. ун-ту. Біологія. Екологія**, 2008; 1 (16):197–203.
4. *Annapurna A., Reddy C.S., Akondi R.B., Rao S.R.* Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats. **J. Pharm. Pharmacol**, 2009; 61(10): 1365–74.
5. *Avogaro A., Albiro M., Menegazzo L. et al.* Endothelial dysfunction in diabetes. The role of reparatory mechanisms. **Diabetes Care**, 2011; 34 (2): S285–S290.
6. *Bayraktutan U.* Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, 2002; 4(4): 224–238.
7. *Bohlen H.G., Lash J.M.* Topical hyperglycemia rapidly suppresses EDRF-mediated vasodilation of normal rat arterioles. **Am. J. Physiol**, 1993; 265: H219–H225.
8. *Calles-Escandon J., Cipolla M.* Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. **Endocrine Reviews**, 2001; 22: 36–52.
9. *Cogolludo A., Frazziano G., Briones A.M.* The dietary flavonoid quercetin activates  $BK_{Ca}$  currents in coronary arteries via production of  $H_2O_2$ . Role in vasodilatation. **Cardiovascular Research**, 2007; 73: 424–431.

10. Cosentino F., Hishikawa K., Katusic Z.S., Lüscher T.F. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells, **Circulation**, 1997; 96: 25–28.
11. De Vriese A.S., Verbeuren T.J., Van de Voorde J. et al. Endothelial dysfunction in diabetes. **Br. J. Pharmacol.**, 2000; 130: 963–974.
12. Dorigo P., Fraccarollo D., Santostasi G., Maragno I. Impairment of endothelium-dependent but not of endothelium-independent dilatation in guinea-pig aorta rings incubated in the presence of elevated glucose, **Br. J. Pharmacol.**, 1997; 121: 972–976.
13. Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr. Rev.**, 2002; 23: 599–622.
14. Geng Y., Xue L., Liu C., Gu Y. Effect of liposomal quercetin on advanced glycation end products and receptor for advanced glycation end products in retina of diabetic rats. **Chin. J. Clinicians (Electronic Edition)**, 2010; 4(12).
15. Geraldès P., King G.L. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. **Circ. Res.**, 2010; 106: 1319–1331.
16. Goel A., Zhang Y., Anderson L., Rahimian R. Gender difference in rat aorta vasodilation after acute exposure to high glucose: Involvement of protein kinase C  $\beta$  and superoxide but not of Rho Kinase. **Cardiovascular Research**, 2007; 76: 351–360.
17. Han G., Yu X., Lu L. et al. Estrogen receptor alpha mediates acute potassium channel stimulation in human coronary artery smooth muscle cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 2006; 316(3): 1025–30.
18. Ishii H., Jirousek M.R., Koya D. et al. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. **Science**, 1996; 272:728–731.
19. Kakimoto M., Inoguchi T., Sonta T. et al. Accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and mitochondrial DNA deletion in kidney of diabetic rats. **Diabetes**, 2002; 51:1588–1595.
20. Keenan H.A., Costacou T., Sun J.K. et al. Clinical factors associated with resistance to microvascular complications in diabetic patients of extreme disease duration: the 50-year medalist study. **Diabetes Care**, 2007; 30: 1995–1997.
21. Kelly G.S. Quercetin. Monograph. **Altern. Med. Rev.**, 2011; 16(2): 172–94.
22. Kyaw M., Yoshizumi M., Tsuchiya K. et al. Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. **Acta Pharmacol. Sin.**, 2004; 25 (8): 977–985.
23. Lakhanpal P., Rai D.K. Role of quercetin in cardiovascular diseases. **Internet J. of Med. Update**, 2008; 3(1): 31–49.
24. Leo C.H., Hart J.L., Woodman O.L. Impairment of both nitric oxide-mediated and EDHF-type relaxation in small mesenteric arteries from rats with streptozotocin-induced diabetes. **Br. J. Pharmacol.**, 2011; 162(2): 365–377.
25. Liu Y., Terata K., Rusch N.J., Gutterman D.D. High Glucose impairs voltage-gated K<sup>+</sup> channel current in rat small coronary arteries. **Circ. Res.**, 2001; 89: 146–152.
26. Lu T., Zhang D.M., Wang X.L. et al. Regulation of coronary arterial BK channels by caveolae-mediated angiotensin II signaling in diabetes mellitus **Circ. Res.**, 2010; 106(6): 1164–1173.
27. Lyle A.N., Griending K.K. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. **Physiology**, 2006; 21(4): 269–280.
28. Panicker S.R., Sreenivas P., Babu M.S. et al. Quercetin attenuates Monocyte Chemoattractant Protein-1 gene expression in glucose primed aortic endothelial cells through NF-kappaB and AP-1. **Pharmacol. Res.**, 2010; 62(4): 328–36.
29. Perez-Vizcaino F., Ibarra M., Cogolludo A.L. et al. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 2002; 302: 66–72.
30. Sano T., Umeda F., Hashimoto T. et al. Oxidative stress measurement by *in vivo* electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, 1998; 41: 1355–1360.
31. Sarkar S., Mandal S., Sinha J. et al. Quercetin: critical evaluation as an antileishmanial agent *in vivo* in hamsters using different vesicular delivery modes. **J. Drug Target**, 2002; 10: 573–578.
32. Schalkwijk C.G., Stehouwer C.D. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. **Clin. Sci. (Lond.)**, 2005; 109(2): 143–59.
33. Soloviev A., Tishkin S., Kyrychenko S. Quercetin-filled phosphatidylcholine liposomes restore abnormalities in rat thoracic aorta BK<sub>Ca</sub> channel function following ionizing irradiation. **Acta Physiologica Sinica**, 2009; 63(3): 201–210.

34. *Spitaler M.M., Graier W.F.* Vascular targets of redox signalling in diabetes mellitus. **Diabetologia**, 2002; 45: 476–494.
35. *Suntres Z.E.* Liposomal Antioxidants for Protection against Oxidant-Induced Damage. **J. of Toxicol**, 2011; P. 1–16.
36. *Taniyama Y., Griendling K.K.* Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, 2003; 42:1075–1081.
37. *Tesfamariam B., Brown M.L., Deykin D., Cohen R.A.* Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. **J. Clin. Invest**, 1990; 85(3): 929–932.
38. The diabetes control and complications trial research group/epidemiology of diabetes interventions and complications research group. Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive therapy. **N. Eng. J. Med**, 2000; 342: 381–389.
39. *Wang S., Xiong X., Song T., Liu L.* Protective effects of cariporide on endothelial dysfunction induced by high glucose. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2005; 26(3): 329–333.
40. *Wei M., Ong L., Smith M.T.* et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. **Heart Lung Circ**, 2003; 12(1): 44–50.
41. *West I.C.* Radicals and oxidative stress in diabetes. **Diabet. Med**, 2000; 17: 171–180.
42. *Wong W.T., Wong S.L., Tian X.Y., Huang Y.* Endothelial dysfunction: the common consequence in diabetes and hypertension. **J. Cardiovasc. Pharmacol**, 2010; 55(4): 300–7.
43. *Yang G., Lucas R., Caldwell R., Yao L.* et al. Novel mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. **J. Cardiovasc. Dis. Res**, 2010; 1(2): 59–63.

## LIPOFLAVON® APPLICATION FOR PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN DIABETIC RATS

**K. I. Klymenko, A. V. Parshikov, A. I. Soloviev**

*State Institution «Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine»  
14, Eugene Pottier St., Kyiv 03680, Ukraine  
e-mail: Kate\_Klimenko@bigmir.net*

It is known that endothelial dysfunction is one of the major factors in development of diabetic cardio-vascular complications. Besides, pathophysiological linkages between high concentration of glucose and vascular dysfunction remain not fully established. The aim of this study was to investigate acetylcholine-induced endothelium-dependent dilation of vascular segments obtained from healthy rats and incubated in hyperglycemic solution and vascular segments from diabetic rats before and after quercetin-filled phosphatidylcholine liposomes (Lipoflavon®) treatment in both *in vitro* and *in vivo* conditions. Changes in vascular tone were registered in isometric mode. Data are presented as mean  $\pm$  SEM with “n” indicating the number of vascular preparations tested. On the day of the experiment diabetic rats showed four times higher blood glucose level and decreased dilation responses to acetylcholine (ACh, 1 nM–10 mM) of aortic rings precontracted with noradrenaline (NA, 1 mM) as compared to controls. Incubation of vascular rings under hyperglycemic (25 mM/L glucose) conditions led to time-dependent impairment of dilation responses as compared to normoglycemic (5.5 mM/L glucose) conditions. Lipoflavon® (3  $\mu$ g/mL of quercetin) application to the organ bath with diabetic rats precontracted vascular rings resulted in a significant reduction in vascular tension. Being added on the plateau of Lipoflavon® relaxation, ACh showed increased dilation responses in comparison to diabetic tissues without Lipoflavon® application. Intravenous Lipoflavon® injections to diabetic rats in concentrations 15 mg/kg or 50 mg/kg of phosphatidylcholine restored dilatation responses up to the control level. In conclusion, we confirmed that hyperglycemia is one of the main factors leading to impairment of endothelium-dependent vasodilation. Quercetin-filled phosphatidylcholine liposomes significantly improve endothelium-dependent

relaxation of isolated vascular rings from diabetic rats. We assume that Lipoflavon® is perspective in treatment of diabetic angiopathies.

**Keywords:** diabetic vascular complications, endothelial dysfunction, quercetin, Lipoflavon®.

## ПРИМЕНЕНИЕ ЛИПОФЛАВОНА® ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

**К. И. Клименко, А. В. Паршиков, А. И. Соловьев**

Государственное учреждение “Институт фармакологии и токсикологии  
Национальной академии медицинских наук Украины”  
ул. Эжена Потье, 14, Киев, 03680, Украина  
e-mail: Kate\_Klimenko@bigmir.net

Известно, что нарушение функционирования эндотелия играет важнейшую роль в развитии сердечно-сосудистых осложнений сахарного диабета. Кроме того, на сегодня патофизиологическая связь между высоким уровнем глюкозы крови и сосудистой дисфункцией окончательно не изучена. Целью работы стало исследование эндотелийзависимого расслабления изолированных колец аорты здоровых крыс в условиях гипергликемии, а также диабетических до и после влияния кверцетинсодержащих фосфатидилхолиновых липосом (препарат Липофлавон®) при его применении как *in vitro*, так и *in vivo*. Регистрацию изменений сосудистого тонуса проводили в изометрическом режиме. Все данные представлены как среднее арифметическое  $M$  и стандартная ошибка среднего арифметического  $m$  для определенной выборки  $n$ . В день эксперимента диабетическая группа (стрептозотоцин, 65 мг/кг) демонстрировала увеличение уровня глюкозы крови в 4 раза, а также снижение дилататорных реакций на ацетилхолин (АХ, 1 нМ – 10 мкМ) предварительно сокращенных норадреналином (НА, 1 мкМ) изолированных колец аорты, по сравнению с контрольной группой. Инкубация в условиях гипергликемии (25 мМ/л глюкозы) привела к зависимому от времени инкубации (4 или 6 часов) снижению дилатации по сравнению с нормогликемическими (5,5 мМ/л глюкозы) условиями. Апликация Липофлавона® (3 мкг/мл за кверцетином) в камеру с сосудистыми препаратами диабетических крыс после прекострикции НА способствовала снижению их тонического напряжения. После чего препараты демонстрировали увеличение дилатации на АХ относительно диабетических сосудов без апликации Липофлавона®. Внутривенное введение Липофлавона® в обеих концентрациях (15 мг/кг или 50 мг/кг в перерасчете на лецитин-стандарт или 0,4 мг/кг и 1,4 мг/кг в перерасчете на кверцетин) вызывала восстановление дилататорных реакций до уровня контрольной группы. Полученные данные подтверждают роль гипергликемии как одного из основных факторов развития нарушений эндотелийзависимого расслабления сосудов. Кверцетинсодержащие фосфатидилхолиновые липосомы в виде препарата Липофлавон® приводят к восстановлению сниженной эндотелийзависимой дилатации сосудов крыс с экспериментальным диабетом. Поэтому можно утверждать, что данный препарат имеет большие перспективы в лечении диабетических ангиопатий.

**Ключевые слова:** сосудистые осложнения сахарного диабета, эндотелиальная дисфункция, кверцетин, Липофлавон®.

Одержано: 08.07.2013