

ЭФФЕКТ ВОДНОГО ЭКСТРАКТА ПРОПОЛИСА НА СКОПЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА У КРЫС ПРИ ИНДУЦИРОВАНИИ БОГАТОГО В ХОЛЕСТЕРИНЕ РЕЖИМА

М.С. КВОН*, З.З. ХАН*, С.И. ПАРК*, И.С. ЧОЙ*, Х. ЛИМ*, С.Д. КИМ²,
Х.С. КИМ¹, КОРЕЯ

M.S. KWON*, Z.Z. HAN*, S.Y. PARK*, Y.S. CHOI*, H. LIM*, S.D. KIM², H.C. KIM¹

¹Neurotoxicology Program, Section of Pharmacol. & Toxicol., College of Pharmacy, Kangwon National University & Korea Institute of Drug Abuse, Chuncheon 200-701, KOREA

²Biosoft Technologies, Biotechnology innovation Center, Chuncheon 200-160, KOREA

* Dept. of Immunopharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Kangwon National University & Korea Institute of Propolis, Chuncheon 200-701, KOREA

Phone: 0082-33-250-8653, Fax: 0082-33-251-7719, E-mail: sangkwon@kangwon.ac.kr

Введение

Холестерин давно известен как фактор риска в случае сердечно-сосудистых заболеваний. В течение последних 60 лет, отношение между режимом жиров и атеросклерозом было сюжетом многочисленных исследований. Эпидемиологические исследования показали, что режимы питания, богатые в холестерине являются атерогенными, а концентрации холестерина с липопротеинами высокой плотности в плазме косвенно коррелированы с частотой коронарных заболеваний.

Все растения содержат фенольные кислоты. Было показано, что р-кумариновая кислота проявляет гипохолестериновую активность у крыс.

Прополис – натуральное смолистое вещество, собранное пчелами с почек и коры ряда деревьев. Затем они складывают прополис внутри улья. Прополис характеризуется богатым содержанием флавоноидных компонентов, в том числе р-кумариновой кислоты, ферулиевой и других фенольных кислот. Предварительные данные показали, что водный экстракт прополиса, содержащий р-кумариновую и феруловую кислоту оказал защитный эффект на острую гепато-токсичность, индуцируемой CCl₄ у крыс. Ряд клинических докладов показали понижение гиперлипидемии и эффект прополиса в лечение атеросклероза и сердечных заболеваний.

Цели

Настоящая работа проведена для выяснения эффекта водной вытяжки прополиса (WEB) на уровень жиров в крови и сыворотке, а также на гистологическое изменение печени. Были исследованы крысы, которых кормили богатым в холестерине режимом. Наше исследование направлено в основном на определение прополиса как возможной питательной добавки, предназначенной для сокращения уровня холестерина.

Материал и методика

1. Животные

В нашей работе использовали 24 крысы (самцы) Sprague-Dawley Charles от River Japan Inc. Каждая крыса весила по 90-120 г, а возраст – 5 недель. Крыс разделили на 4 группы и лечили в течение 6 недель.

Группа А получила основной режим. Группа Б получила плюс 1% холестерина и 0,25% холата натрия; группы В и Г получили режим как и группа Б, но им через рот давали 6 недель по 75 мг/кг и, соответственно, 150 мг/кг WEB.

После экспериментального периода крысы не получили корма в течение 16 часов. Их анестезировали двуокисью углерода для взятия проб. Были взяты пробы крови, сгущение которых проходило при комнатной температуре. Сыворотка подготовлена центрифугированием крови при 2000 G в течение 10 мин.

Печень вырезана, прополаскивана, взвешена и консервирована во льду. Кусок печени отрезан для приготовления микросом. Микросомы печени и аликоты сыворотки хранили при -70°C до начала анализов.

2. Анализ липидов

Небольшие аликоты сыворотки от каждой крысы использованы для анализа общего холестерина, в том числе HDL (Sigma Diagnostics) и триглицеридов (Boehringer Mannheim Diagnostics). Малондиальдегид определен по методу ОХАГАВА с сотр.

Значения LDL получены вычетом HDL из общего холестерина (для каждой крысы).

Печеночные липиды определены как описано раньше (ДЖЕННИНГС с сотр.). Холестерин измерен колориметрическим методом, а триглицериды измерены использованием энзиматического кита (Asan Chemical Co.).

3. Морфология печеночных тканей

Для микроскопического анализа печеночных клеток кусочки печени хранили в 10%-ом растворе формола, который меняли ежедневно до окрашивания. Фрагменты, окрашенные гематоксилин-эозином анализируются световым микроскопом при увеличении 400X.

4. Анализ данных

Данные анализируются тестом ANOVA и новым тестом Дункана многосложного сравнения.

Результаты

1. Поглощение продуктов, увеличение веса тела и органов

Не отмечено различий по среднему поглощению продуктов и увеличению веса (таблица I).

Таблица I

Повышение веса тела, поглощение корма и норма эффективности скормливания крысам опытных режимов в течение 6 недель

Группа	Повышение веса тела (г/день)	Поглощение корма (г/день)	Норма эффективности кормления
А	3,312±0,12	18,95±0,32	0,175±0,08
Б	3,383±0,21	18,89±0,40	0,179±0,03
В	3,356±0,18	19,25±0,26	0,174±0,06
Г	3,362±0,24	19,14±0,46	0,176±0,03

Группа А: основной режим

Группа Б: основной режим + 1% холестерина и 0,25% холата натрия

Группа В: режим группы Б + 75 мг/кг/день WEP

Группа Г: режим группы Б + 150 мг/кг/день WEP

Значения представляют среднюю ± СО (стандартное отклонение) (n = 6)

Вес почек и сердца не представлял достоверных различий между группами, но скормливание 1% холестерина и 0,25% холата натрия привели к достоверному увеличению веса печени, сравнительно с основным режимом. Это может быть результатом всасывания жиров печенью (таблица II).

Таблица II

Вес органов крыс, которым скормливали опытные режимы кормления (г/100 г веса тела)

Группа	Печень	Почки	Сердце
А	3,53±0,20	0,75±0,05	0,40±0,02
Б	3,94±0,12*	0,79±0,06	0,39±0,02
В	3,91±0,23*	0,79±0,04	0,39±0,01
Г	3,90±0,18*	0,77±0,04	0,41±0,02

Группа А: основной режим

Группа Б: основной режим + 1% холестерина и 0,25% холата натрия

Группа В: режим группы Б + 75 мг/кг/день WEP

Группа Г: режим группы Б + 150 мг/кг/день WEP

Значения представляют среднюю ± СО (стандартное отклонение) (n = 6)

*Достоверная разница по отношению к основному режиму группа А (P < 0,05)

2. Содержание липидов в сыворотке

Таблица III показывает уровни общего холестерина в кровяной сыворотке, уровни холестерина ТГ и LDL в четырех группах. Отмечена достоверная разница между уровнями общего холестерина сыворотки четырех групп. Уровни холестерина в сыворотке были достоверно выше при добавлении 1% холестерина и 0,25% холата натрия, по сравнению с основными режимами. Применение режимов с 75 мг/кг и, соответственно, 150 мг/кг WEP с 1% холестерина и 0,25% холата натрия вели к достоверному сокращению уровня общего холестерина в сыворотке сравнительно с основными режимами. Скормливание крысам 75 мг/кг и, соответственно, 150 мг/кг/день WEP с 1% холестерина и 0,25% холата натрия сократило содержание триглицеридов в сыворотке, но сокращение было намного выше в группе, которой скормливали 150 мг/кг WEP. В группах, которым

скармливали 75 и, соответственно, 150 мг/кг WEP в условиях режимов с добавлением холестерина, HDL проявляет достоверное повышение по сравнению с группой основного режима. Сокращенный атерогенный показатель отмечен в двух разных дозах в группах, получающих WEP; он также достоверно сокращен в сравнении с режимом с добавлением холестерина.

Таблица III

Содержание липидов в сыворотке крыс, кормленных опытными режимами

	Группа А	Группа Б	Группа В	Группа Г
Общий холестерин (мг/дл)	90,08 ±7,47**	116,71 ±4,07	103,87 ±13,04*	93,57 ±9,58**
Холестерин HDL (мг/дл)	41,73 ±3,70	45,85 ±5,58	53,79 ±5,86*	51,30 ±5,66**
Холестерин LDL (мг/дл) ¹	37,15 ±5,11*	49,26 ±3,65	36,10 ±11,04*	29,99 ±8,68*
Холестерин HDL (%)	46,42 ±3,29*	39,20 ±3,61	52,28 ±7,33**	55,52 ±6,47**
Триглицерид (мг/дл)	55,91 ±7,35**	99,73 ±8,91	69,91 ±5,95**	61,40 ±3,96**
Атерогенный показатель ²	1,16 ±0,15*	1,57 ±0,22	0,94 ±0,27**	0,83 ±0,20**

Группа А: основной режим

Группа Б: основной режим + 1% холестерина и 0,25% холата натрия

Группа В: режим группы Б + 75 мг/кг/день WEP

Группа Г: режим группы Б + 150 мг/кг/день WEP

¹Холестерин LDL: [LDL - C] = [Т - С] - [HDL - C] + [ТГ/5]

²Атерогенный показатель: ([Т - С] - [HDL - C]) / [HDL - C]

Значения представляют среднюю ± СО (n = 6)

* и ** были достоверно разными по сравнению со средней для режимов, богатых в холестерине группы Б

(P < 0,05 и, соответственно, P < 0,01)

3. Общий холестерин в печени и печеночный ТГ

У крыс, которым скармливали 70 и 150 мг/кг WEP, с добавлением 1% холестерина и 0,25% холата натрия, отмечено достоверно пониженный уровень общего холестерина, чем в группе, получающей основной режим (Рис. 1).

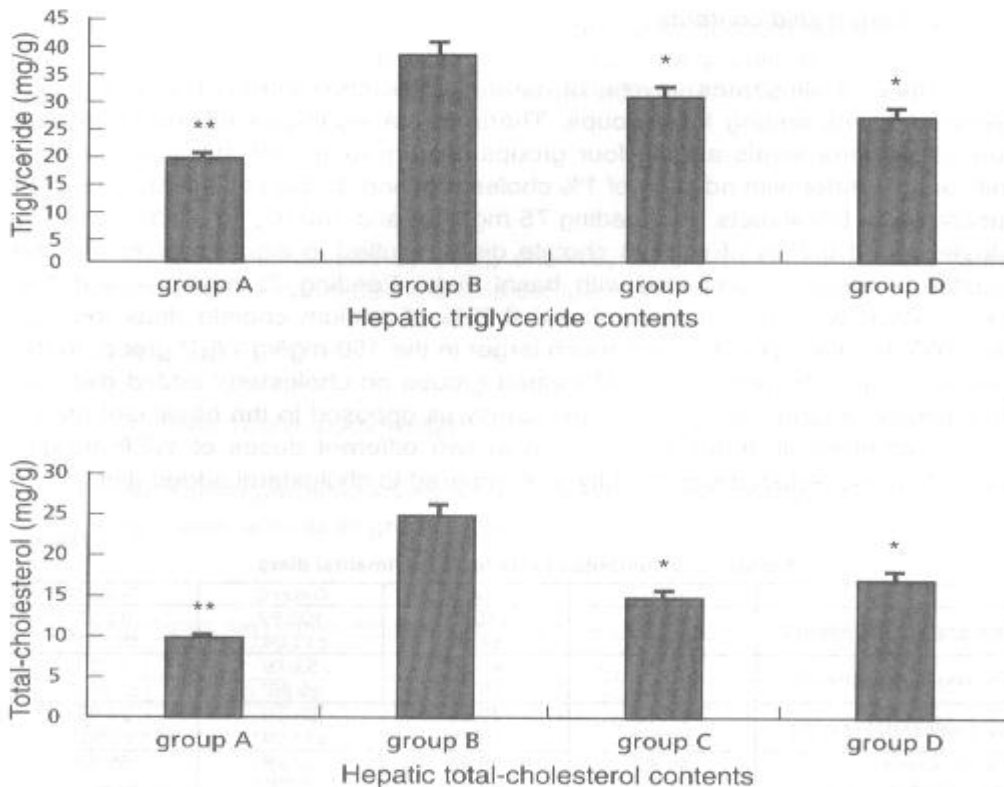


Рис. 1. Содержание липидов в печени крыс, которым скармливали опытные режимы

Группа А: основной режим; Группа Б: основной режим + 1% холестерина и 0,25% холата натрия; Группа В: режим группы Б + 75 мг/кг/день WEP; Группа Г: режим группы Б + 150 мг/кг/день WEP;

Значения представляют среднюю ± СО (n = 6); * и ** были достоверно разными по сравнению со средней для режимов, богатых в холестерине группы Б (P < 0,05 и, соответственно, P < 0,01)

В верхней части: Содержание печеночного триглицерида; с левой стороны триглицериды (мг/г)

В нижней части: Содержание общего холестерина в печени; с правой стороны всего холестерина (мг/г)

4. Уровень MDA в кровяной сыворотке

Крысы, которым скармливали 75 и, соответственно, 150 мг/кг WEP, с добавлением 1% холестерина и 0,25% холата натрия показали достоверно пониженный уровень MDA в сыворотке, чем крысы группы, которым скармливали основной режим (Рис. 2).

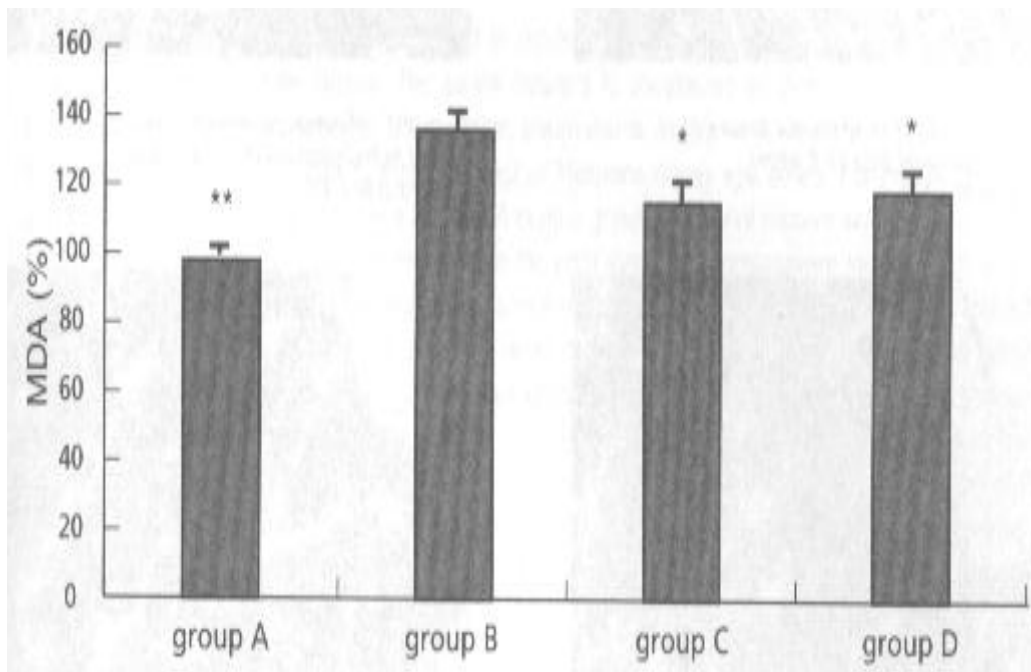


Рис. 2. Концентрация MDA в кровяной сыворотке крыс, которым скармливали опытные режимы

Группа А: основной режим; Группа Б: основной режим + 1% холестерина и 0,25% холата натрия; Группа В: режим группы Б + 75 мг/кг/день WEP; Группа Г: режим группы Б + 150 мг/кг/день WEP;

Концентрация MDA (%) в сыворотке сравнена со средней группы А (средняя группы А = 100%); Значения представляют среднюю ± СО (n = 6); * и ** были достоверно разными по сравнению со средней для режимов, богатых в холестерине группы Б (P < 0,05 и, соответственно, P < 0,01)

5. Исследование печеночных тканей световым микроскопом

Как видно из рисунков 3–6, аккумуляция межклеточных липидов и гистопатологические изменения печеночных тканей отмечены у всех крыс групп, которым скармливали 1% холестерина и 0,25% холата натрия. Расположение межклеточных липидов в меньшей степени отмечено в группах с добавлением WEP.

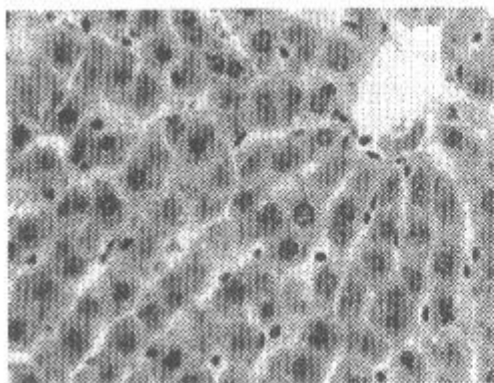


Рис. 3. Морфология печеночных тканей у крыс, которым скармливали основной режим в течение 6 недель (группа А) × 400

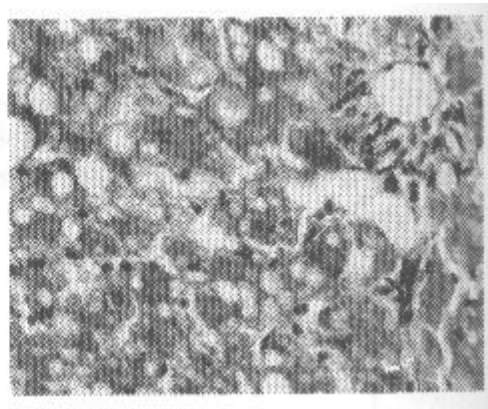


Рис. 4. Морфология печеночных тканей у крыс, которым скармливали богатые в холестерине режимы в течение 6 недель (группа Б) × 400

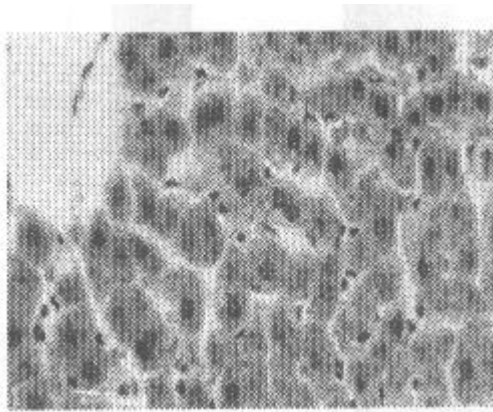


Рис. 5. Морфология печеночных тканей у крыс, которым скармливали режим группы Б + 75 мг/кг/день WEP в течение 6 недель (группа В) × 400

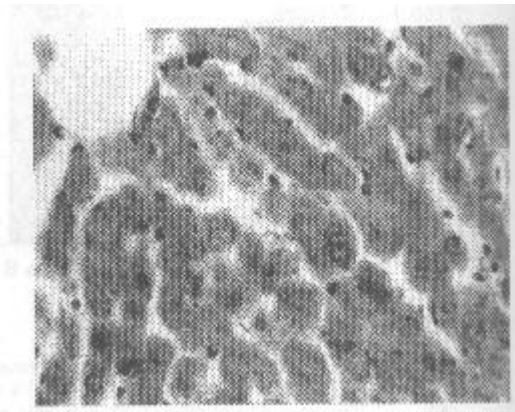


Рис. 6. Морфология печеночных тканей у крыс, которым скармливали режим группы Б + 150 мг/кг/день WEP в течение 6 недель (группа Г) × 400

Выводы

Добавление WEP, как в количестве 75 мг/кг, так и 150 мг/кг, к богатому в холестерине режиму вызвало не только сокращение уровня общего холестерина, LDL, MDA и ТГ в кровяной сыворотке, но и концентрации общего холестерина и ТГ в печени. После добавления 75 мг/кг и, соответственно, 150 мг/кг WEP у крыс, которым скармливали богатые в холестерине продукты отмечен повышенный уровень HDL.

Можем заключать, что добавление WEP в корм может проявлять гипохолестериновый эффект.

ЛИТЕРАТУРА

- Clifton P.M., Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk. *Curr Opin Lipidol* 6 (1995), 20-29
Jennings C.D., Boleyn K., Bridges S.R., Wood P.J., Anderson J.W., A comparison of the lipid-lowering and intestinal morphological effects of cholestyramine, chitosan and oat gum in rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 189 (1993), 13
Shama Bhat C., Ramasarma T., Inhibition rat liver mevalonate phosphate kinase by phenyl and phenolic compound. *Biochem. J.*, 181 (1979), 143
Sharma R.D., Isoflavones and hypercholesterolemia in rats. *Lipids*, 14 (1979), 535
Kinch S.H., Doyle J.T., Hilleboe H.E., Risk factors in ischemic heart disease. *Am. J. Public Health*. 53 (1983), 438-449
Ohakawa H., Ohishi N., Yagi K., Assay for lipid peroxidase in animal tissues by thiobarbituric reaction. *Anal. Biochem* 95 (1979), 351