

# КОНДИТЕРСКИЕ ИЗДЕЛИЯ С ДОБАВКАМИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ. 5. КОНДИТЕРСКИЕ ИЗДЕЛИЯ С ДОБАВКОЙ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА КАК ЛЕЧЕБНО- ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА

Н.А.Тюкавкина<sup>1</sup>, И.А.Руленко<sup>1</sup>, Ю.А.Колесник<sup>1</sup>, В.К.Колхир<sup>2</sup>, В.А.Зюзин<sup>2</sup>,  
А.Н.Даурский<sup>3</sup>, И.А.Кондакова<sup>3</sup>, Н.И.Смирнова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова,

<sup>2</sup>НПО "ВИЛАР",

<sup>3</sup>А/О Московская кондитерская фабрика "Красный Октябрь"

Введение дигидрокверцетина (ДКВ) в сахаристые кондитерские изделия на жировой основе способствует стабилизации липидов, что проявляется в улучшении качества и увеличении сроков хранения [1, 2]. С другой стороны представляет интерес использование таких стабилизирующих продуктов в качестве вводимого в организм депо антиоксидантов. Такой способ введения антиоксидантов может способствовать поддержанию определенного уровня ингибиторов пероксидного окисления липидов (ПОЛ) в организме человека, достаточного для торможения свободнорадикальных процессов, активация которых наблюдается при возникновении и развитии широкого круга патологических состояний [3] и при воздействии внешних неблагоприятных факторов [4].

ДКВ является оригинальным отечественным лекарственным средством, обладающим антиоксидантными, капилляропротекторными, противовоспалительными и антигистаминными свойствами [5] и проявляющим радиозащитный эффект [6].

Цель настоящей работы заключалась в оценке антиокислительного действия ДКВ, вводимого в биологическую модель или животным в составе липидной фракции кондитерской массы.

Объектами исследования служили липидные фракции кондитерских изделий (ЛК) рецептур I и II с различным содержанием ДКВ [1]. Предварительно было установлено, что ЛК, извлеченные из кондитерских масс совместно с ДКВ, являются репрезентативной моделью самих кондитерских изделий. О скорости ПОЛ в печени животных и антиокислительном действии ЛК кондитерских изделий судили по количеству образующегося продукта ПОЛ - малонового диальдегиду (МДА), определяемого по методике [7].

Для выявления антиокислительной активности ЛК использовали два пути. Один был моделированием патологического в условиях *in vitro*, другой - в *in vivo* при внутрижелудочном введении ДКВ. В обоих случаях оценку уровня ПОЛ осуществляли в гомогенатах печени животных.

Эксперименты *in vitro* проводили в условиях индуцированного ПОЛ системой Fe<sup>2+</sup>-аскорбат. Результаты исследования ЛК рецептуры I представлены в табл. 1 и на рис.1. Добавление ЛК (без ДКВ) к гомогенату приводило к снижению концентрации МДА на 15 или 22% в зависимости от внесенного количества. Проявление антиокислительного действия самими липидами обусловлено содержащимися в них эндогенными антиоксидантами, в частности, а-токоферолом. Проявляемый ЛК антиокислительный эффект далее учитывался в оценке действия ДКВ.

Таблица 1.

Влияние кондитерской массы рецептуры на накопление МДА в гомогенате печени крыс.

Кол-во ДКВ,ог массы липидов	Кол-во ДКВ, мкг/г печени	Концентр рация МДА, мкМ/мг белка	АО-1 %	АО-2 %
10 мг/г липидов, содержащихся в инкубационной смеси				
Контроль		329	-	0
ЛК без ДКВ	-	280	-	14.9
ЛК+0.05%	10	-23±8*	8.1	21.9
ЛК + 0.2%	40	-52±9**	18.4	30.7
ЛК+0.5%	100	-62±11**	23.4	33.7
ЛК + 1.0%	200	-74±6**	26.3	37.4
100 мг/г				
Контроль	-	32S	-	0
ЛК без ДКВ	-	256	-	22.2
ЛК+0.05%	100	-46±6**	18.1	36.2
ЛК+0.2%	400	-65±9**	25.4	42.0
ЛК+0.5%	1000	-101±10**	39.4	52.0
ЛК + 1.0%	2000	-87±15**	34.0	48.7

Примечание: АО-1 - антиоксидантный эффект по сравнению с ЛК без ДКВ; АО-2 - антиоксидантный эффект по сравнению с контролем. " -  $p < 0.05$  \*\* -  $p < 0.01$

ЛК, содержащие ДКВ, вызывали достоверное дозозависимое снижение скорости ПОЛ по сравнению как с контролем, так и с ЛК без ДКВ. При этом антиокислительный эффект усиливался с увеличением количества ДКВ и достигал максимальных значений (53% и 49%) при концентрации 1000 мкг/г печени (100 мг ЛК с 0.5% ДКВ на 1 г печени) и 2000 мкг/г (100 мг ЛК с 1% ДКВ на 1 г печени).

Данные, полученные в результате исследования ЛК рецептуры II, приведены в табл. 2. В этом случае ЛК без ДКВ снижали скорость ПОЛ на 7% (10 мг/г) и 16.6% (100 мг/г) по сравнению с контролем. Меньшая антиоксидантная активность ЛК рецептуры II согласуется с ранее высказанным предположением о роли эндогенных антиоксидантов. В состав рецептуры II не входят жиросодержащие компоненты, являющиеся преимущественными носителями эндогенных антиоксидантов, например продукты какао бобов, которые составляют значительную часть рецептуры I.

**Таблица 2.**

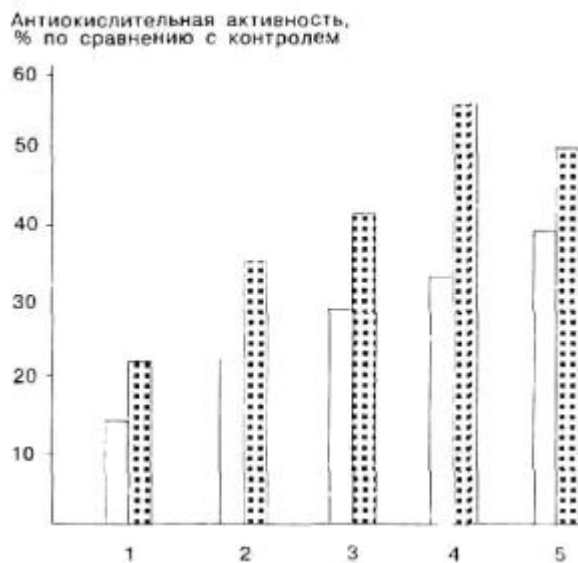
Влияние кондитерской массы рецептуры II на накопление МДА в гомогенате печени крыс.

Кол-во ДКВ, от массы липидов	Кол-во ДКВ. мкг/г печени	Концентрация МДА, мкМ/мг белка	АО-1 %	АО-2 %
10 мг/г липидов, содержащихся в инкубационной смеси				
Контроль ЛК без ДКВ	-	329	-	0
	-	363	-	7.3
ЛК+0.2%	40	-44±16*	12.0	18.7
ЛК+0.5%	100	-45±13*	12.4	18.9
ЛК+1.0%	200	-62±10**	17.0	23.3
100 мг/г				
Контроль ЛК без ДКВ	-	392	-	0
	-	327	-	16.6
ЛК+0.2%	400	-37±14*	11.4	26.1
ЛК+0.5%	1000	-128±15**	39.2	49.3
ЛК+1.0%	2000	-96*18**	29.4	«.,

Примечание: АО-1 - антиоксидантный эффект по сравнению с ЛК без ДКВ; АО-2 - антиоксидантный эффект по сравнению с контролем. \* - p<0.05

\*\* - p<0.01

Наличие ДКВ в ЛК рецептуры II достоверно усиливало антиокислительную активность. При концентрации ДКВ в инкубационной смеси 400 мкг/г печени выраженность эффекта была максимальной (41% от контроля). Интересно, что такую же антиоксидантную активность при этой концентрации ДКВ проявляли ЛК рецептуры I.



антиоксидантный эффект по сравнению с контролем. \* -  $p < 0.05$  \*\* -  $p < 0.01$

**Рис. 1.** Антиокислительная активность кондитерских изделий рецептуры I с различным содержанием ДКВ по отношению к процессам ПОЛ в гомогенатах печени. 1 - липиды без ДКВ; 2 - липиды с 0.05% ДКВ; 3 - липиды с 0.2% ДКВ; 4 - липиды с 0.5% ДКВ; 5 - липиды с 1.0% ДКВ. О 10 мг/г печени; ▨ 100 мг/г печени.

Результаты экспериментов достоверно свидетельствуют о проявлении антиокислительного действия липидными фракциями, выделенными из кондитерских масс с добавкой ДКВ. Наибольший эффект, а именно 2-кратное замедление процессов ПОЛ, оказывали ЛК с 0.5 и 1.0% ДКВ.

С целью выявления влияния ЛК, содержащих ДКВ, на скорость ПОЛ в печени в условиях многократного перорального применения были проведены эксперименты на животных. В течение 7 дней мышам выводили ЛК в 200 мг/мышь (100 мг/кг в пересчете на ДКВ) на фоне дистрофического поражения печени четыреххлористым углеродом. В данном случае (в отличие от опытов *in vitro*) индукция ПОЛ в печени осуществлялась прижизненно в результате поражения паренхимы печени сильным ядом  $CCl_4$ , стимулирующим процессы свободнорадикального окисления. Поэтому для оценки уровня МДА в печени была использована методика определения спонтанного ПОЛ.

Объектами исследования служили ЛК, выделенные из кондитерских изделий рецептур I и II с 1.0% ДКВ от массы липидов.

Полученные результаты представлены в табл. 3 и обработаны статистически с использованием критерия Стьюдента.

Поражение печени мышей в конце эксперимента четыреххлористым углеродом приводило к 3-кратному повышению скорости ПОЛ. Предварительное 7-дневное введение ЛК без ДКВ рецептуры I и рецептуры II предохраняло на 20.5 и 4.3%% соответственно клетки печени от усиления процессов пероксидации. Введение ЛК с 1.0% ДКВ приводило к заметному увеличению антиоксидантного эффекта (на 15 и 17%% соответственно по сравнению с контролем).

Таблица 3.

Проявление антиоксидантного эффекта рецептур I и II при 7-дневном введении мышам при поражении печени четыреххлористым углеродом.

Группа животных	Кол-во ДКВ, мкг/кг	Концентрация МДА, мкМ/мг белка	АО-1, %	АО-2, %
Интактная	-	54±6	-	-
Контроль	-	142±12	-	0
ЛК без ДКВ рецептуры I	-	113±5	-	20.5
ЛК+1.0% ДКВ рецептуры I	100	97±4	15	31.7
ЛК без ДКВ рецептуры II	-	136±10	-	4.3
ЛК+1.0% ДКВ рецептуры II	100	113±7	17	20.5

Примечание: АО-1 - антиоксидантный эффект по сравнению с ЛК без ДКВ; АО-2 - антиоксидантный эффект по сравнению с контролем.

На основании проведенной экспериментальной работы можно прийти к заключению, что липидные фракции из кондитерских масс, содержащих ДКВ, обладают антиокислительной активностью, которая проявляется как в условиях опытов на биологической модели, так и при применении внутрь. Свободнорадикальные реакции тормозятся наиболее заметно при использовании кондитерских масс, содержащих 0.5-1.0% ДКВ. Существенных различий в этом плане между липидами из шоколадной (рецептура I) и конфетной (рецептура II) массами не обнаружено. Это свидетельствует о том, что антиокислительное действие было обусловлено ДКВ независимо от состава кондитерской массы. Недавно было сообщено об ингибировании ССЦ-индуцированной микросомальной липидной перекисидации фенольными соединениями, в том числе и дигидрокверцетином [8].

Токсическое воздействие на печень мышей СС14 приводило к значительному усилению процессов ПОЛ, что сравнимо с ситуацией, наблюдаемой при отравлении различными ядами, при воздействии канцерогенных веществ, ионизирующей радиации, при развитии сердечно-сосудистой патологии и др. При многократном применении внутрь ЛК, содержащих ДКВ, выявлена отчетливая тенденция к замедлению СС14-индуцированных свободнорадикальных реакций в печени животных. Следовательно, кондитерские изделия с ДКВ могут служить источником недостающих живому организму антиоксидантов. Это обстоятельство имеет большое значение для обоснования возможности использования кондитерских изделий с добавкой ДКВ в качестве лечебно-профилактических средств.

## Экспериментальная часть

Опыты in vitro. Проводили с использованием гомогената печени 30 белых беспородных крыс обоего пола массой 200-250 г. Животных забивали декапитацией, извлекали печень, промывали физиологическим раствором и готовили навески по 0.5 г для гомогенизации. За сутки до забоя животные питания не получали.

Опыты in vivo. Проводили на 60 белых беспородных мышах весом 20-22 г.

Животные были разделены на 6 групп по 10 мышей в каждой:

- 1-й группе (интактная группа) внутривенно вводили водопроводную воду в объеме 0.2 мл и не подвергали действию СС14;
- 2-й группе (контроль на ЛК без ДКВ) вводили воду и в конце эксперимента СС14;
- 3-й группе (контроль на ДКВ) вводили в расплавленном виде 200 мг ЛК без ДКВ рецептуры I;
- 4-й группе (опытная) вводили ЛК рецептуры I с 1.0% ДКВ;
- 5-й группе (контроль на ДКВ) вводили ЛК рецептуры II без ДКВ;
- 6-й группе (опытная) вводили ЛК рецептуры II с 1.0% ДКВ.

Испытуемые пробы вводили натошак ежедневно в течение 7 дней. На 7-й день эксперимента, через 30 мин после последнего введения испытуемой пробы, подкожно вводили ССЦ (в виде 50% масляного раствора) из расчета 0.08 мл/мышь, что быстро приводило к развитию дистрофических процессов в печени. Через 3 ч после поражения печени животных забивали и печень забирали для гомогенизации.

Определение МДА при спонтанном ПОЛ. 0.5 г печени гомогенизировали с 5 мл трис-НСI буфера (рН 7.4). Получившуюся инкубационную смесь разливали по 2 мл в пробирки и инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 мин при постоянном встряхивании. Реакцию останавливали путем добавления 2 мл 30% раствора трихлоруксусной кислоты. Затем в каждую пробирку приливали по 0.2 мл 5 М НСI и 2 мл 0.8% водного раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК) и смесь нагревали на горячей (85-90°C) водяной бане 20 мин, охлаждали и центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Оптическую плотность измеряли при длине волны 535 нм. Концентрацию МДА рассчитывали, исходя из молярного коэффициента экстинкции ( $\epsilon$ ) пигмента, образованного МДА с ТБК, равного  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , в нМ/г белка или мкМ/мг.

Определение МДА при индуцированном ПОЛ. 0.5 г печени гомогенизировали с 5 мл трис-НСI буфера (рН 7.4), содержащего  $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (6.6 мг/100 мл) и аскорбиновую кислоту (14 мг/100 мл). Дальнейшая последовательность работ с инкубационной смесью аналогична методике определения спонтанного ПОЛ.

ЛК, в виде растопленной массы, добавляли к навеске печени непосредственно перед гомогенизацией в количестве 10 или 100 мг на 1 г печени, что соответствовало концентрации ДКВ от 10 до 2000 мкг/г печени в зависимости от исходного процентного содержания.

Контролем служили исходные гомогенаты печени и гомогенаты печени с добавленной липидной фракцией без ДКВ в количестве 10 или 100 мг/г печени.

Экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием разностного метода в сравнении опытных данных с контрольными [9].

## Выводы:

1. Установлено, что липидные фракции кондитерских масс, содержащие ДКВ от 0.05 до 1.0%, проявляют антиокислительную активность в условиях  $\text{Fe}^{2+}$ -аскорбат-индуцированного ПОЛ в гомогенате печени крыс. Наибольшую активность проявляют кондитерские массы рецептур I и II с 0.5 и 1.0% ДКВ. Под их влиянием процессы ПОЛ в печени замедляются примерно в 2 раза.

2. Показано, что при профилактическом введении внутрь в течение 7 дней липидов кондитерских изделий с 1.0% ДКВ существенно предохраняется печень животных (мышей) от усиления процессов ПОЛ под влиянием СС14.

3. На основании проведенных экспериментов можно рекомендовать использование кондитерских масс рецептур I и II с 0.5 и 1.0% ДКВ с лечебно-профилактическими целями в условиях повышенного риска усиления ПОЛ.

**Список литературы:**

1. Тюкавкина Н.А., Руленко И.А., Колесник Ю.А. и др. Кондитерские изделия с добавками биологически активных веществ. 2. Антиоксидантное действие дигидрокверцетина в составе сахаристых кондитерских изделий на жировой основе //В печати.
2. Колесник Ю.А., Тюкавкина Н.А., Руленко И.А. и др. Кондитерские изделия с добавками биологически активных веществ 4. Характеристика продуктов окисления липидов сахаристых кондитерских изделий на жировой основе // В печати.
3. Барабой В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений //Киев.: Наукова думка, 1976.-С.25-26.
4. Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты //Успехи химии.-1985.-Т.54.-Вып.9.-С. 1540-1558.
5. Соколов С.Я., Тюкавкина Н.А., Колхир В.К. и др. Антиоксидантное, капилляропротекторное, противовоспалительное и антигистаминное средство //Полож. решение по авт. заявке N 5048842/14 (029985), приоритет от 23.06.92.
6. Ильющенко Т.Ю., Хоменко А.И., Фригидова Л.М. и др. Фармакологические и радиозащитные свойства некоторых производных гамма-пирона //Фармакол. и токсикол.-1975.-Т.38.-М 5.-С.607-612
7. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах //М.: Наука, 1972.-С 241-242.
8. Cholbi M.R., Paya M., Alcaraz M.J. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl<sub>4</sub> microsomal lipid peroxidation //Experientia.-1991.-Vol.47.-N 2.-P.195-199
9. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов в экспериментальных исследованиях //Патолог., физиолог. и эксперимент, терапия.-1960-N 4.-С 76-85.