

© Коллектив авторов, 2012
УДК 615.322.015.42

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРЯМОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ФИТОЭКДИСТЕРОНА *IN VITRO*

А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, В.В. Давыдов, В.Н. Дармограй

ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Рязань

В исследовании *in vitro* установлено, что фитозкдистерон, выделенный из смолёвки поникшей и смолёвки татарской, активирует процесс образования супероксидного анион-радикала в модельных системах аутоокисления кверцетина и адреналина. Показано, что фитозкдистерон подавляет развитие аскорбат- и НАДФН₂-зависимого железоиндуцируемого перекисного окисления липидов. По способности подавлять аскорбат-зависимое ПОЛ, фитозкдистерон сопоставим с кудесаном (витамин Е и коэнзим Q10).

Ключевые слова: фитозкдистерон, супероксидный анион-радикал, перекисное окисление липидов, *in vitro*.

Процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) занимают важное место в патогенезе большинства заболеваний [5]. Поэтому антиоксиданты, вещества подавляющие развитие процессов ПОЛ и образование свободных радикалов, все чаще используются врачами разных специальностей. Среди этих средств различают истинные антиоксиданты – вещества природного и синтетического происхождения, непосредственно взаимодействующие со свободными радикалами, и антиоксиданты, обладающие непрямым (косвенным) действием, которое реализуется через тесно связанные с липопероксидацией процессы энергостабилизации, гидролиза липидов, синтеза лейкотриенов и простагландинов [3]. В свою очередь истинные антиоксиданты влияют на разные этапы перекисидации: на образование супероксидного радикала – аскорбиновая кислота, на гидроксильный радикал – убихинон, витамин Е [10, 12].

Экдистероиды – группа липофильных полигидроксилированных стероидов, участвующих в жизнедеятельности практически всех организмов [11]. Являясь у насекомых гормонами линьки, у человека

они регулируют множественные функции и оказывают разнообразные эффекты: анаболический, ранозаживляющий, ноотропный, гипогликемический, иммуномодулирующий и др. [9]. Их антиоксидантные свойства, как и механизм действия, изучены недостаточно.

Одним из представителей экдистероидов является фитозкдистерон (ФЭ), обладающий основными эффектами, присущими данному классу соединений, и широко распространенный в растениях центральной полосы России.

Цель исследования – изучить прямую антиоксидантную активность фитозкдистерона *in vitro*.

Материалы и методы

В исследовании использована водная вытяжка из смолёвки поникшей (*Silene nutans*) и смолёвки татарской (*Silene tatarica*), содержащая 0,1% ФЭ. Концентрацию вещества определяли спектрофотометрически при длине волны 242 нм [2].

Для оценки антисупероксидной активности ФЭ использовали 2 модельные системы генерации супероксидного радикала.

В первой модельной системе использовали спонтанное окисление кверцетина

[4]. В состав реакционной смеси входили: 0,5 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,8, 2,4 мл дистиллированной воды или раствора изучаемого вещества, 0,058 мл тетраметилэтилендиамина (ТМЭД), 0,08 ммоль ЭДТА. Реакцию начинали внесением в среду инкубации 0,1 мл 0,462 мМ раствора кверцетина. Пробы инкубировали на водяной бане в течение трех минут при температуре 37⁰С, затем регистрировали изменение оптической плотности при длине волны 406 нм.

Вторая модельная система основана на спонтанном окислении адреналина [6]. Состав реакционной смеси включал: 2 мл 0,2 М бикарбонатного буфера, рН 10,65 и 0,1 мл раствора исследуемого вещества или бикарбонатного буфера (контроль). Реакцию начинали внесением в среду инкубации 0,1 мл 0,1% раствора адреналина (аптечный раствор). Пробы инкубировали в течение трех минут при температуре 25⁰С, затем регистрировали изменение оптической плотности при длине волны 347 нм.

Об антисупероксидной активности изучаемых веществ судили по проценту ингибирования аутоокисления кверцетина и адреналина (А %), рассчитанному по формуле: $A \% = (OD_1 - OD_2) / OD_1 \times 100$, где OD_1 – изменение оптической плотности пробы без препаратов, OD_2 – изменение оптической плотности пробы в присутствии исследуемых препаратов.

Влияние ФЭ на свободнорадикальное окисление, индуцируемое двухвалентным железом, изучали в двух метаболизирующих модельных системах, с использованием в качестве субстрата гомогенат мозга беспородных белых крыс.

В состав первой модельной системы (неферментативного аскорбатзависимого ПОЛ) входили: 0,6 мл гомогената мозга крыс, 0,6 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,4 мл 72 мкМ раствора соли Мора, 0,4 мл 4,8 мМ раствора аскорбиновой кислоты, 0,4 мл раствора изучаемого вещества или фосфатного буфера (контроль).

Состав второй модельной системы (ферментативного НАДФН₂-зависимого ПОЛ), включал: 0,6 мл гомогената мозга крыс, 0,6 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,4), 0,4 мл 72 мкМ раствора соли

Мора, 0,4 мл 2,4 мМ раствора НАДФН₂, 0,4 мл раствора изучаемого вещества или фосфатного буфера (контроль) [3]. Данные модельные системы инкубировали на водяной бане при 37⁰С в течение 30 минут при свободном доступе кислорода.

Через 0, 5, 15 и 30 мин из модельной системы забирали по 0,6 мл. В отобранных пробах останавливали биохимические реакции добавлением 0,7 мл 30% раствора трихлоруксусной кислоты. Затем в супернатантах определяли содержание конечного продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) с помощью реакции с тиобарбитуровой кислотой, с измерением оптической плотности при 532 нм [7]. Ингибирование перекисного окисления липидов исследуемыми веществами оценивали как отношение разности между приростом концентрации МДА в опытных и контрольных пробах к приросту концентрации МДА в контрольных пробах. Ингибирование перекисного окисления липидов (%) = $(\Delta E_k - \Delta E_0) / \Delta E_k \times 100\%$, где ΔE_k – прирост концентраций МДА в разные сроки инкубации в пробах, не содержащих препарат, а ΔE_0 – прирост концентраций МДА в пробах, содержащих препарат. Прирост концентраций МДА оценивали через 5 минут (E_5 минут – E_0 минут), через 15 минут (E_{15} минут – E_5 минут) и через 30 минут (E_{30} минут – E_{15} минут).

В качестве препаратов сравнения при изучении антисупероксидной активности ФЭ использовали аскорбиновую кислоту фирмы «Serva», а при изучении антиоксидантной активности в метаболизирующих модельных системах – кудесан фирмы «Аквион» (1 мл кудесана содержит 30 мг коэнзима Q₁₀ (CoQ) и 4,5 мг витамина Е (вит Е)). Каждая серия включала по 7 исследований. Измерение экстинкции выполняли на биохимическом анализаторе Humalizer 2000. Полученные результаты обрабатывались статистически с использованием программы «Биостат», при этом рассчитывались среднее значение (М) и ошибка среднего значения (m). Различия между группами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), тест Ньюмена-Кейсла [1]. За уровень достоверности принята достоверность различий 95,0% (p<0,05).

Результаты и их обсуждение

При изучении антисупероксидной активности аскорбиновой кислоты и ФЭ были получены следующие результаты, представленные на рисунках 1 и 2.

Аскорбиновая кислота в концентрациях от 1,3 мМ до 0,035 мМ ингибировала самоокисление кверцетина с 95,45% ($p < 0,05$) до 43,97% ($p < 0,05$) соответственно, а в концентрациях от 0,1 мМ до 0,001 мМ – процесс самоокисления адреналина с 98,87% ($p < 0,05$) до 13,59% ($p < 0,05$). В отличие от этого, ФЭ достоверно ($p < 0,05$) активировал как процесс самоокисления кверцетина (от 46,15% в концентрации 1,3 мМ до 7,69% в концентрации 0,035 мМ), так и окисление адреналина (от 150,40% в концентрации 0,1 мМ до 23,83% в концентрации 0,005 мМ).

Влияние кудесана и ФЭ на процессы аскорбат-зависимого ПОЛ представлены в таблице 1. В дозе 400 мкл (конечная концентрация в растворе 1,86 мМ вит Е, 5,72 мМ СоQ) кудесан ускорял процессы ПОЛ, о чем свидетельствует увеличение накопления МДА (на 29,05%, $p < 0,05$) в течение первых 5 минут инкубации. В более низких дозировках 150 мкл (0,7 мМ вит Е, 2,15 мМ СоQ), 40 мкл (0,186 мМ вит Е, 0,572 мМ СоQ) и 4 мкл (0,0186 мМ вит Е, 0,0572 мМ СоQ) кудесан дозозависимо подавлял процессы ПОЛ, вызывая уменьшение накопления МДА вплоть до 15 минуты инкубации. К 30 минуте инкубации происходило истощение антиоксидантной системы и повышение концентрации МДА.

ФЭ достоверно дозозависимо подавлял аскорбатзависимое ПОЛ во всех концентрациях при инкубации в течение 15 минут. К 30 минуте, так же как и при использовании кудесана, происходило истощение антиоксидантной системы и повышение накопления МДА. По способности подавлять аскорбат-зависимое ПОЛ, ФЭ сопоставим с известным антиоксидантом кудесаном и лишь незначительно уступал ему.

Изучение НАДФН₂-зависимого ПОЛ показало, что кудесан в высоких концентрациях более выражено подавлял его по сравнению с ФЭ (таблица 2). Дозы 400 мкл (конечная концентрация в растворе

1,86 мМ вит Е, 5,72 мМ СоQ) и 150 мкл кудесана (0,7 мМ вит Е, 2,15 мМ СоQ) подавляли процесс накопления МДА на 85,42% и 50,59% через 5 минут инкубации, и на 67,53% ($p < 0,05$) и 57,46% ($p < 0,05$) через 15 минут соответственно. К 30 минуте инкубации происходило истощение антиоксидантной системы защиты, и концентрация МДА увеличилась в большей степени, чем в контроле. В дозе 4 мкл (конечная концентрация в растворе 0,0186 мМ вит Е, 0,0572 мМ СоQ) кудесан подавлял процесс накопления МДА через 5 минут инкубации на 4,15% ($p > 0,05$), через 15 минут на 17,91% ($p < 0,05$), а через 30 минут на 10,07% ($p < 0,05$). ФЭ постепенно дозозависимо подавлял процесс накопления МДА. Однако, к 30 минуте инкубации, так же как и кудесан, ФЭ в конечных концентрациях в растворе 0,35 мМ, 0,13 мМ, 0,035 мМ ускорял процесс накопления МДА на 71,14% ($p < 0,05$), на 6,27% ($p > 0,05$) и на 28,52% ($p < 0,05$) соответственно. В конечных концентрациях в растворе 0,035 мМ и 0,0035 мМ способность ФЭ подавлять НАДФН₂-зависимое ПОЛ оказалась сопоставимой с кудесаном.

В нашей работе установлено, что ФЭ в условиях *in vitro* способен подавлять развитие как аскорбат-, так и НАДФН₂-зависимого ПОЛ, причем по влиянию на аскорбат-зависимый процесс он сопоставим с известным антиоксидантом кудесаном. Вероятно, установленное прямое антиоксидантное действие ФЭ связано с большим количеством гидроксильных групп в его молекуле [10, 11].

Представляют интерес полученные нами данные о способности ФЭ дозозависимо ускорять аутоокисление адреналина и кверцетина. Процесс самоокисления адреналина инициируется супероксидным анион-радикалом, возникающим при взаимодействии адреналина со следами металлов в щелочной среде. Ускорение данного процесса может происходить при повышении температуры, защелачивании конечного раствора, добавлении в среду инкубации окислителей (например, $K_3[Fe(CN)_6]$) или генераторов супероксидного радикала (гидроперекись-третбутила) [6]. При окислении

кверцетина в щелочной среде в присутствии ТМЭДА одним из промежуточных продуктов окисления является супероксидный анион-радикал. Усиление окисления кверцетина возможно при добавлении в среду инкубации ионов двухвалентного железа или генераторов супероксидного радикала (гидроперекись-третбутила), а также при повышении температуры данной среды [4]. Согласно химической структуре, ФЭ не является окислителем. При изучении рН и температуры конечных растворов после добавления ФЭ установлено, что они остаются индифферентными.

Наконец, если бы ФЭ генерировал супероксидный радикал, то происходило бы усиление как аскорбат-, так и НАДФН₂-зависимого ПОЛ. Однако нами показано, что ФЭ в равной степени подавляет оба эти процесса. Следовательно, ФЭ потенцирует самоокисление адреналина и кверцетина, действуя как катализатор (ускоряя лимитирующую стадию данных реакций, то есть – процесс образования супероксидного радикала).

Таким образом, в данном исследовании установлено, что ФЭ *in vitro* обладает способностью ускорять образование супероксидного радикала, но в тоже время тормозит аскорбат- и НАДФН₂-зависимое перекисное окисление липидов. Это позволяет предположить, что ФЭ, обладая антиоксидантным действием, не будет подавлять стимуляцию ряда стрессовых белков и антиоксидантных ферментов, индуцируемых активными формами кислорода [8], а возможно даже усилит этот процесс.

С другой стороны, наличие у ФЭ способности катализировать реакции образования супероксидного радикала позволит создавать на его основе новые модельные системы для изучения антисупероксидной активности лекарственных препаратов *in vitro*.

Выводы

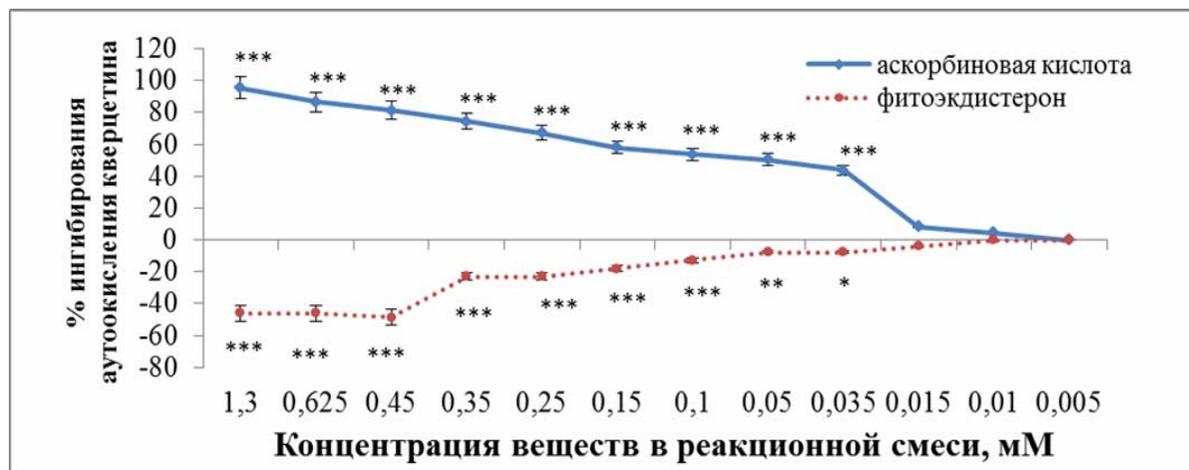
1. Фитоэкдистерон, выделенный из смолевки поникшей и смолевки татарской, активизирует образование супероксидного анион-радикала.

2. Фитоэкдистерон дозозависимо ингибирует железоиндуцируемое аскорбат- и НАДФН₂-зависимое ПОЛ в гомогенатах мозга крыс.
3. По способности подавлять железоиндуцируемое аскорбат-зависимое ПОЛ фитоэкдистерон сопоставим с антиоксидантом кудесаном.
4. По способности подавлять железоиндуцируемое НАДФН₂-зависимое ПОЛ фитоэкдистерон значительно уступает кудесану.

Литература

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Дармограй В.Н. Фармакогностическое изучение некоторых видов семейства гвоздичных и перспективы использования их в медицинской практике: дис. в виде науч. доклада ... д-ра фарм. наук / В.Н. Дармограй. – Рязань, 1996. – 91 с.
3. Зарубина И.В. Молекулярная фармакология антигипоксантов / И.В. Зарубина, П.Д. Шабанов. – СПб.: ООО «Издательство Н-Л», 2004. – 368 с.
4. Костюк В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалева // *Вопр. мед. химии.* – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88-91.
5. Ланкин В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при заболеваниях сердечно сосудистой системы / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков. – М.: РКНПК МЗ РФ, 2001. – 78 с.
6. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы / Т.В. Сирота // *Вопр. мед. химии.* – 1999. – №3. – С. 53-55.
7. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Горишвили // *Современные методы в биохимии* / под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

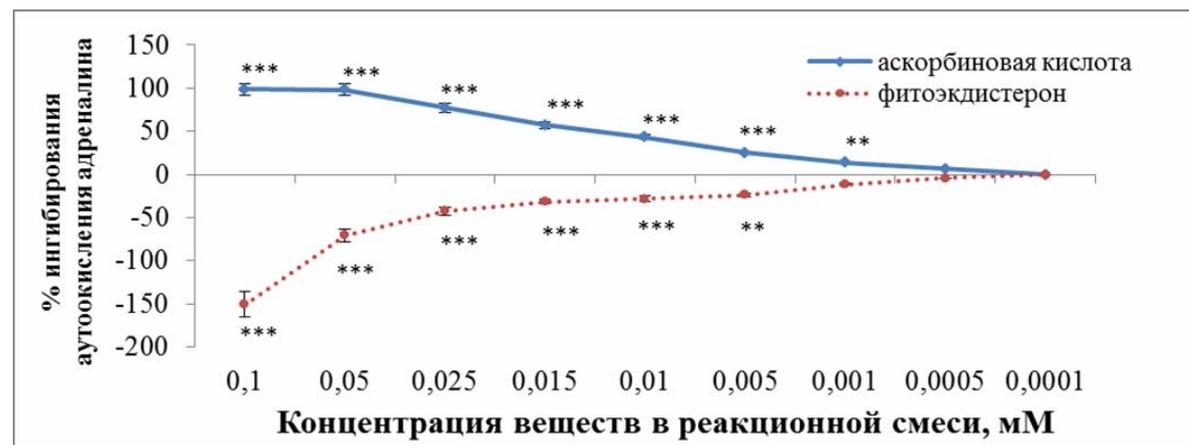
Рисунок 1. Влияние фитоэкдистерона и аскорбиновой кислоты на аутоокисление кверцетина in vitro ($M \pm m$).



Обозначения:
 * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** –
 $p < 0,001$ –
 достоверные различия
 по сравнению с пробами,
 не содержащими
 изучаемые вещества.

Отформатировано:
 Шрифт: 8 пт

Рисунок 2. Влияние фитоэкдистерона и аскорбиновой кислоты на аутоокисление адреналина in vitro ($M \pm m$).



Обозначения:
 ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ –
 достоверные различия
 по сравнению с пробами, не
 содержащими изучаемые
 вещества.

Отформатировано:
 Шрифт: 11 пт

Отформатировано:
 Шрифт: 8 пт

Таблица 1. Влияние фитозкдистерона и кудесана на железоиндуцируемое аскорбатзависимое ПОЛ в гомогенатах мозга (M±m)

Серии исследований	Использованные дозировки и объемы исследуемых препаратов								
	0,35 мМ экдистерон	0,13 мМ экдистерон	0,035 мМ экдистерон	0,0035 мМ экдистерон	1,86 мМ витЕ, 5,72 мМ СоQ (кудесан 400 мкл)	0,7 мМ вит Е 2,15 мМСо Q (кудесан 150 мкл)	0,186 мМ вит Е 0,572 мМ СоQ (кудесан 40 мкл)	0,0186 мМ вит Е 0,0572 мМ СоQ (кудесан 4 мкл)	400 мкл буфера
% ингибирования через 5 мин	21,79 ±2,11*	14,864 ±1,23*	14,02 ±0,79*	10,47 ±1,32*	-29,05 ±1,21*	29,73 ±2,3*	12,66 ±1,3*	22,97 ±5,4*	0,00 ±2,34
% ингибирования через 15 мин	24,67 ±1,78*	9,727 ±0,45*	7,47 ±1,09*	8,36 ±0,78*	69,39 ±6,8*	29,54 ±1,66*	7,29 ±0,45	-20,28 ±3,45*	0,00 ±4,58
% ингибирования через 30 мин	-68,87 ±3,74*	-0,26 ±0,056	-13,05 ±1,21*	-20,09 ±2,24*	-75,76 ±4,34*	-0,68 ±0,11	-19,67 ±2,33*	17,24 ±3,45*	0,00 ±5,33

Таблица 2. Влияние фитозкдистерона и кудесана на железоиндуцируемое НАДФН₂ зависимое ПОЛ в гомогенатах мозга (M±m)

Серии исследований	Использованные дозировки и объемы исследуемых препаратов								
	0,35 мМ экдистерон	0,13 мМ экдистерон	0,035 мМ экдистерон	0,0035 мМ экдистерон	1,86 мМ витЕ, 5,72 мМ СоQ (кудесан 400 мкл)	0,7 мМ вит Е 2,15 мМСо Q (кудесан 150 мкл)	0,186 мМ вит Е 0,572 мМ СоQ (кудесан 40мкл)	0,0186 мМ вит Е 0,0572 мМ СоQ (кудесан 4 мкл)	400 мкл буфера
% ингибирования через 5 мин	31,32 ±3,21*	11,23 ±1,11*	3,16 ±0,91	3,90 ±0,36	85,42 ±6,33*	50,59 ±4,98*	6,13 ±0,45	4,15 ±0,77	0,00 ±6,54
% ингибирования через 15 мин	6,96 ±0,23	4,73 ±0,67	24,81 ±3,12*	5,97 ±0,46	67,53 ±6,23*	57,46 ±2,34*	33,58 ±2,36*	17,91 ±2,1*	0,00 ±7,26
% ингибирования через 30 мин	-71,14 ±8,12*	-6,27 ±2,34	-28,52 ±2,76*	19,80 ±1,03*	-10,78 ±2,34*	-26,84 ±2,15*	-18,12 ±2,11*	10,07 ±0,74*	0,00 ±6,60

8. Степаненко И.Л. Регуляция генных сетей стрессового ответа активными формами кислорода / И.Л. Степаненко // Экологическая генетика. – 2004. – Т. 2, №1. – С. 4-12.
9. Сыров В.Н. Фитоэкдистероиды: биологические эффекты в организме высших животных и перспективы использования в медицине / В.Н. Сыров // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1994. – №5. – С. 61-66.
10. Flora S.J.S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloids exposure / S.J.S. Flora // Oxid. Med. Cell. Longev. – 2009. – Vol. 2, Is. 4. – P. 191-206.
11. Lafont R. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update / R. Lafont, L. Dinan // J. Insect. Sci. – 2003. – Vol. 3, Is. 7. – P. 30.
12. Poli G. Oxidative stress and cell signalling / G. Poli, F. Leonarduzzi, E. Biasi // Curr. Med. Chem. – 2004. – Vol. 11. – P. 1163-1182.

THE STUDY OF THE DIRECT ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHYTOECDYSTERONE IN VITRO

A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva, V.V. Davydov, V.N. Darmogray

In vitro studies revealed that phytoecdysterone isolated from *Silene nutans* and *Silene tatarica* activates the formation of superoxide in model systems of quercetin and adrenaline autooxidation. It is shown that phytoecdysterone suppresses the development of an ascorbate and NADPH₂-dependent iron induced lipid peroxidation. Phytoecdysterone is comparable with cudesane (vitamin E and coenzyme Q10) on ability to suppress ascorbate-dependent lipid peroxidation.

Keywords: *phytoecdysterone, superoxide, lipid peroxidation, in vitro.*

Алексей Владимирович Шулькин – старший лаборант кафедры фармакологии с курсом фармакотерапии ФПДО.

г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, корп. 2, фармацевтический корпус, 3 этаж.

E-mail: alekseishulkin@rambler.ru.

Елена Николаевна Якушева – заведующая кафедрой фармакологии с курсом фармакотерапии ФПДО, д.м.н., доцент.

Виктор Викторович Давыдов – профессор кафедры патофизиологии, д.м.н., профессор.

Василий Николаевич Дармограй – заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники, д.ф.н., профессор.