

Сравнительная оценка антиоксидантных свойств полифенолов из ядровой древесины и клеточной культуры маакии амурской

Азарова О.В.¹, Брюханов В.М.¹, Булгаков В.П.², Зверев Я.Ф.¹, Лампатов В.В.¹, Федореев С.А.³

Comparative assessment of antioxidant properties of polyphenols from heartwood and *Maackia amurensis* callus culture

Azarova O.V., Bryukhanov V.M., Bulgakov V.P., Zverev Ya.F., Lampatov V.V., Fedoreyev S.A.

¹ Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

² Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, г. Владивосток

© Азарова О.В., Брюханов В.М., Булгаков В.П. и др.

Полифенольные комплексы ядровой древесины и клеточной культуры маакии амурской (*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.) при длительном введении крысам в дозе 100 мг/кг массы тела проявили выраженное влияние на активность свободно-радикального окисления. В условиях индуцированного оксидативного стресса оба полифенольных комплекса подавляли прооксидантную активность, непосредственно воздействуя на продукты свободно-радикального окисления. Ингибирующее воздействие на выработку активных форм кислорода, характерное для обоих фитокомплексов, обусловлено подавлением механизмов как ферментативной, так и неферментативной защиты.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, полифенольный комплекс, маакия амурская, культура клеток.

On long-term introduction to rats in dosage 100 mg/kg polyphenol complexes from heartwood and callus culture of *Maackia amurensis* Rupr. et Maxim. had a marked influence on the activity of free radical oxidation. Under conditions of induced oxidant stress both polyphenol complexes inhibited prooxidant activity directly affecting the products of free radical oxidation. Inhibiting influence on the production of oxygen active forms that is characteristic for both phytocomplexes is determined by inhibition of mechanisms both enzymatic and non-enzymatic defense.

Key words: antioxidant activity, polyphenol complex, *Maackia amurensis*, callus culture.

УДК 615.322.014.425:582.736.091:633.875.2

Введение

В настоящее время установлено гепатопротективное и желчегонное действие полифенолов ядровой древесины маакии амурской (*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.), доминирующими из которых являются изофлавоны, птерокарпаны, моно- и олигомерные стильбены, изофлавоностильбен, стильбенолигнан [10]. Большинство выделенных из маакии фенольных компонентов показали высокую антирадикальную и антиоксидантную активность, сопоставимую с ионолом. Терапевтический эффект запатентованного отечественного гепатопротектора максара, полученного

на основе ядровой древесины маакии, связывают с антиоксидантными свойствами полифенолов, способных нейтрализовать свободные радикалы в процессе свободно-радикального окисления в хиноны [6, 9].

Накопленный опыт выращивания клеточной культуры редкого, имеющего ограниченный ареал распространения растения дальневосточной флоры позволяет предложить новый воспроизводимый источник изофлавоноидов маакии. В результате культивирования в течение 1 мес были получены клеточные культуры из различных вегетативных частей растения, продуцирующие одинаковый набор изофлавонов и птерокарпанов. Важно отметить, что ни одна из полученных

клеточных культур в отличие от нативного растения не продуцирует моно- и димерные стильбены [13].

Цель исследования — проведение сравнительного изучения антиоксидантных свойств полифенольного комплекса из ядровой древесины и клеточной культуры маакии. Кроме того, различия в химическом составе объектов исследования позволяют предположить роль отдельных полифенолов в реализации антиоксидантной активности.

Материал и методы

Полифенольные комплексы ядровой древесины маакии и культуры каллусов получены в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН (г. Владивосток) по ранее описанной методике [7]. Для выделения полифенольного комплекса (ПФК) использовали культуру каллусов, созданную из проростков семян дикорастущего растения маакии (*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.). Культуру клеток маакии (линия А-18) выращивали с использованием питательной среды $W_{B/NAA}$ в течение 35 сут [13].

Эксперименты проведены на беспородных белых крысах массой тела 200—250 г, которых содержали в условиях свободного доступа к воде и пище. Животные были разделены на четыре группы: I — 14 интактных животных; у 15 крыс II (контрольной) группы моделировали окислительный стресс, индуцируя экссудативный воспалительный отек задних конечностей путем субплантарного введения 0,2 мл 3%-го раствора формалина. Крысы данной группы на протяжении 2 нед до введения флогистика получали крахмальную слизь в режиме, идентичном режиму применения фитопрепаратов маакии. Животным III и IV групп (в каждой по 15 крыс) на протяжении 14 дней вводили внутривентрикулярно ПФК маакии и клеточной культуры в виде суспензии на 2%-й крахмальной слизи соответственно. Крысы III и IV экспериментальных групп получали фитокомплексы в оптимально эффективной дозе 100 мг/кг массы тела, установленной в серии предварительных экспериментов по изучению антиоксидантной активности фитокомплексов и полифенолов маакии. По окончании курса введения стимулировали свободно-радикальное окисление субплантарным введением флогистика.

На пике воспалительной реакции через 2—3 сут после применения флогистика исследовали кровь, сравнивая полученные значения с показателями интактных

и контрольных крыс. Общую прооксидантную активность (ОПА), суммарный показатель концентрации всех прооксидантов и свободно-радикальных метаболитов оценивали по содержанию в плазме крови продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), реагирующих с тиобарбитуровой кислотой [5]. Определяли также концентрацию малонового диальдегида (МДА) и других тиобарбитуратчувствительных продуктов (ТБРП), образующихся в ходе реакций ПОЛ [4]. Антиоксидантную активность в гемолизате эритроцитов оценивали по изменению интегративного показателя общей антиоксидантной активности [2], а также по изменению активности антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы [8, 11].

Полученные результаты подвергали статистической обработке методом вариационных рядов с использованием *t*-критерия Стьюдента [1]. Различия сравниваемых данных, представленных в виде доверительного интервала ($X \pm m$), считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Типичный окислительный стресс, возникающий на пике воспалительной реакции, характеризуется резким повышением активности прооксидантной системы (ТБРП и ОПА) с последующей активацией ферментов антиоксидантной защиты и интегративного показателя общей антиоксидантной активности. Данная модель позволяет оценить стимулированное свободно-радикальное окисление как диалектическое взаимодействие прооксидантного и антиоксидантного процессов [3]. Полученные данные четко указывают на накопление свободных радикалов в результате окислительного стресса. На фоне развития окислительного стресса оба фитопрепарата маакии фактически предотвращали активацию перекисного окисления в равной степени. При этом содержание ТБРП практически не отличалось от величины, характерной для интактных крыс (таблица). Показатель ОПА в случае применения ПФК клеточной культуры снижался до величин, характерных для интактных животных, а в III группе был почти вдвое ниже контроля, значительно уступая ОПА плазмы интактных животных. Это свидетельствует об уменьшении количества свободных радикалов в плазме за счет их «гашения» полифенолами маакии амурской [12].

Влияние длительного (14 дней) введения полифенольного комплекса ядровой древесины и клеточной культуры маакнии (100 мг/кг массы тела) на оксидантный статус плазмы крови крыс и состояние антиоксидантной защиты ($X \pm m$)

| Показатель | Группа животных | | | |
|--|-----------------|----------------|----------------------|----------------------|
| | I | II | III | IV |
| ТБРП, мкмоль | 2,50 ± 0,18 | 4,20 ± 0,18* | <u>2,30 ± 0,17</u> | <u>2,40 ± 0,18</u> |
| ОПА, % | 45,10 ± 1,06 | 60,10 ± 1,25* | <u>31,10 ± 1,19*</u> | <u>47,60 ± 1,12</u> |
| Каталаза, % | 12,20 ± 1,27 | 22,40 ± 1,02* | 20,50 ± 0,82* | <u>14,30 ± 0,72</u> |
| Супероксиддисмутаза, % | 16,90 ± 0,81 | 28,30 ± 1,05* | 30,00 ± 0,80* | <u>19,40 ± 1,01</u> |
| Глутатионпероксидаза, ед./мг гемоглобина | 233,00 ± 7,30 | 243,00 ± 11,20 | 250,00 ± 4,90 | <u>209,00 ± 5,60</u> |
| Общая антиоксидантная активность, % | 73,70 ± 0,51 | 87,80 ± 0,86* | <u>75,90 ± 1,57</u> | <u>54,60 ± 1,70*</u> |

Примечание. * — достоверные изменения по отношению к интактным крысам. Подчеркнуты достоверные изменения по отношению к контрольным животным ($p < 0,05$).

Моделирование окислительного стресса у контрольных животных активировало антиоксидантные механизмы, что выразилось в значительном повышении активности ферментов каталазы и СОД. Это закономерно привело к достоверному росту интегративного показателя общей антиоксидантной активности более чем на 14%. Применение ПФК ядровой древесины маакнии существенно не повлияло на активность антиоксидантных ферментов, показатели которых практически не отличались от таковых в контрольной группе. Напротив, при использовании препарата клеточных культур было зафиксировано достоверное снижение активности каталазы и СОД по сравнению с показателями II группы практически до показателей, характеризующих группу интактных животных. Что касается активности глутатионпероксидазы, то в случае применения ПФК клеточной культуры зафиксировано гораздо более существенное снижение ее активности, что, по-видимому, указывает на повышенное расходование именно этого фермента. Содержание глутатионпероксидазы оказалось на 14 и 10% ниже аналогичного показателя во II и I группах соответственно. На фоне снижения активности антиоксидантных ферментов при применении полифенолов клеточной культуры закономерным является падение общей антиоксидантной активности в 1,6 раза по сравнению с крысами с контрольным воспалением и в 1,3 раза по сравнению со здоровыми животными. С другой стороны, падение общей антиоксидантной активности до показателей интактных крыс при применении ПФК ядровой древесины без существенного влияния на активность антиоксидантных ферментов, очевидно, можно связать с преимущественной активизацией в условиях эксперимента неферментных механизмов антиоксидантной защиты, которые определяются не-

которыми водорастворимыми соединениями, находящимися в плазме крови (аскорбат, глутатион, мочевиная кислота и др.), а также рядом жирорастворимых компонентов клеточных мембран (α -токоферол, ретинол и др.).

При длительном введении крысам полифенолы ядровой древесины и клеточной культуры маакнии амурской проявили выраженное влияние на активность свободно-радикального окисления. В условиях индуцированного оксидативного стресса оба полифенольных комплекса подавляли прооксидантную активность, прямо воздействуя на продукты свободно-радикального окисления. Ингибирующее воздействие на антиоксидантный статус, характерное для обоих фитокомплексов, обусловлено подавлением механизмов как ферментативной, так и неферментативной защиты.

Учитывая различия в химическом составе ПФК из нативного растения и из клеточной культуры, которая не содержит моно- и димерных стильбенов [13], можно предположить, что стимулирование неферментативных факторов антиоксидантной активности, отмеченное в большей степени для полифенолов нативного растения, обусловлено наличием стильбенов. С другой стороны, содержание суммы полифенолов в фитокомплексах клеточных культур и в ядровой древесине растения примерно одинаково [9]. Однако, возможно, большее содержание изофлавоноидов в клеточных культурах, чем в ядровой древесине, из-за отсутствия в них стильбенов определяет снижение активности антиоксидантных ферментов под действием ПФК клеточной культуры.

Заключение

В результате сравнительного изучения антиоксидантных свойств полифенольных комплексов ядровой

древесины и клеточной культуры маакии амурской установлено влияние обоих фитокомплексов маакии на свободно-радикальное окисление, сопровождающееся прямым подавлением активности свободных радикалов и активацией неферментных механизмов антиоксидантной защиты, особенно выраженное для полифенолов нативного растения.

Исследования проведено при поддержке грантов РФФИ № 06-04-48068 и 07-04-12020 и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН.

Литература

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Медгиз, 1963. 152 с.
2. Благородов С.Г., Шепелев А.П. Методы определения антиоксидантной активности // Хим.-фарм. журн. 1987. № 3. С. 292—294.
3. Брюханов В.М., Зверев Я.Ф., Арбузова Я.С. и др. Оксидантный статус и активность антиоксидантных ферментов у крыс с экспериментальным воспалением // Рос. физиол. журн. 2004. Т. 90, № 8. С. 35—36.
4. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
5. Галактионова Л.П., Молчанов А.В., Ельчанинова С.А. и др. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки // Клинич. и лаб. диагностика. 1998. № 4. С. 11—14.
6. Максимов О.Б., Горовой П.Г., Кольцова Е.А. и др. Природные антиоксиданты // Вестн. ДВО РАН. 1996. № 1. С. 40—50.
7. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. 1986. № 12. С. 724—727.
8. Патент РФ № 2104027. Способ получения растительных полифенолов, обладающих гепатозащитным действием / О.Б. Максимов, Н.И. Кулеш, С.А. Федореев и др. БИ. 1998. № 4.
9. Саратиков А.С., Чучалин В.С., Ратькин А.В. и др. Гепатопротекторные свойства полифенольных комплексов из древесины и клеточной культуры маакии амурской // Экспер. и клин. фармакол. 2005. Т. 68, № 2. С. 51—54.
10. Федореев С.А., Кулеш Н.И., Глебо Л.И. и др. Препарат максар из дальневосточного растения маакии амурской // Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38, № 11. С. 22—26.
11. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. 1991. № 10. С. 11—13.
12. Янькова В.И., Иванова И.Л., Федореев С.А., Кулеш Н.И. Антиоксидантное действие гепатопротектора максара при экспериментальном диабете // Экспер. и клин. фармакол. 2002. Т. 65, № 4. С. 33—36.
13. Fedoreyev S.A., Pokushalova T.V., Veselova M.V. et al. Isoflavonoid production by callus culture of *Maackia amurensis* // Fitoterapia. 2000. V. 71. P. 365—372.

Поступила в редакцию 13.02.2009 г.

Утверждена к печати 22.12.2009 г.

Сведения об авторах

О.В. Азарова — канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии АГМУ (г. Барнаул).

В.М. Брюханов — д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии АГМУ (г. Барнаул).

В.П. Булгаков — член-корреспондент РАН, д-р биол. наук, профессор отдела биотехнологии Биолого-почвенного института ДВО РАН (г. Владивосток).

Я.Ф. Зверев — д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии АГМУ (г. Барнаул).

В.В. Лампатов — д-р биол. наук, профессор кафедры фармакологии АГМУ (г. Барнаул).

С.А. Федореев — канд. хим. наук, лаборатория химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН (г. Владивосток).

Для корреспонденции

Зверев Яков Фёдорович, тел. (3852) 26-08-35, e-mail: zver@asmu.ru.