

Антиоксидантный и прооксидантный эффекты арбутина и гидрохинона в эксперименте *in vitro*

Волобой Н.А., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М., Талалаева О.С., Замятина С.В., Зяблова О.Н., Смирнов И.В.

Antioxydant and prooxydant effects of arbutin and hydrochinon in experiment *in vitro*

Voloboy N.L., Zverev Ya.F., Bryukhanov V.M., Talalayeva O.S., Zamyatina S.V., Zyablova O.N., Smirnov I.V.

Алтайский государственный медицинский университет, г. Барнаул

© Волобой Н.А., Зверев Я.Ф., Брюханов В.М. и др.

Проведено сравнение антиоксидантной и прооксидантной активности арбутина и гидрохинона *in vitro*. Антиоксидантную и прооксидантную активность арбутина и гидрохинона оценивали по их способности подавлять (индуцировать) окисление ТВИН-80. Арбутин и гидрохинон обладают антиоксидантными и прооксидантными свойствами. В эксперименте *in vitro* установлено, что в разных концентрациях влияние исследуемых веществ на процессы свободнорадикального окисления неодинаково: гидрохинон в большей степени является антиоксидантом, арбутин — прооксидантом.

Ключевые слова: арбутин, гидрохинон, свободнорадикальное окисление, антиоксидантная активность, прооксидантная активность.

The object of research is to compare antioxidant and prooxydant activity of arbutin and hydrochinon *in vitro*. Antioxydant and prooxydant activity of arbutin and hydrochinon is estimated of their ability to suppress/ induce oxydation ТВИН-80. Arbutin and hydrochinon have antioxydant and prooxydant properties. The conclusions are, that hydrochinon is more antioxydant, arbutin is more prooxydant.

Key words: arbutin, hydrochinon, free radical oxydation, prooxydant activity.

УДК 615.014.425:547.918:547.565.2]:57.085.2

Введение

На сегодняшний день очевидно, что генерация свободных радикалов является одним из универсальных патогенетических механизмов повреждения клетки. От функционирования процессов свободнорадикального окисления (СРО) в значительной степени зависит структурно-функциональная целостность клеток и тканей организма. Антиоксидантная система противостоит повреждающему эффекту свободных радикалов, непрерывно образующихся в организме человека [9].

Использование антиоксидантов, веществ, способных ингибировать процессы СРО в объектах природного происхождения, получило широкое распространение в различных областях химии, биологии и медицины [6]. При патологических состояниях организма дисбаланс

в антирадикальной системе может регулироваться природными и синтетическими антиоксидантами.

Наличие антиоксидантных свойств в природных соединениях открывает возможности создания новых лекарственных препаратов и биологически активных добавок, предназначенных для лечения и профилактики различных заболеваний, нормализации обмена веществ и т.д. С другой стороны, известно, что большинство антирадикальных соединений характеризуются двухфазным действием, т.е. антиоксидантный эффект при превышении некоторой пороговой величины сменяется прооксидантным действием [5]. Основными выявленными на настоящий момент факторами, определяющими возможность инверсии антиоксидантных свойств, являются концентрация самого антиоксиданта, концентрация и химическая структура субстрата окисления и наличие

в реакционной среде катионов металлов переходной валентности [8].

В связи с этим вопрос о необходимости детального изучения механизмов влияния природных антиоксидантов на процессы СРО является важной задачей современной науки.

В ряду известных антиоксидантов наибольшим разнообразием химических свойств и биологической активности обладают фенольные соединения [1], к которым относятся арбутин и гидрохинон. Считается, что арбутин и продукт его гидролиза гидрохинон обуславливают мочегонное, противовоспалительное и антисептическое действие многих растений, применяемых в урологической практике [12, 13]. Кроме того, установлено, что арбутин тормозит перекисное окисление линолевой кислоты, а с гидрохиноном связывают антигипоксические свойства листьев толокнянки [11]. Экспериментально доказано, что экстракты из растений, содержащих арбутин, в опытах на животных оказывают выраженное антиоксидантное действие [2, 9]. Однако какова роль арбутина и гидрохинона в реализации этого антиоксидантного эффекта? Ранее были проведены исследования по определению антиоксидантной активности арбутина и гидрохинона *in vivo* [4]. Полученные результаты потребовали дополнительных исследований для уточнения влияния арбутина и гидрохинона на процессы свободнорадикального окисления *in vitro*, чему и посвящена данная работа.

Материал и методы

Для оценки прооксидантной и антиоксидантной активности арбутина и гидрохинона в условиях *in vitro* проведено две серии опытов: в первой серии экспериментов исследовали растворы арбутина и гидрохинона в концентрациях $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, во второй — растворы арбутина и гидрохинона в концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Определение общей антиоксидантной активности (ОАА) арбутина и гидрохинона основано на их способности подавлять Fe^{2+} /аскорбатиндуцированное окисление твин-80 в модельной системе с последующим колориметрическим измерением продуктов окисления твин-80, ассоциированных с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [3]. К 2 мл 1%-го раствора твин-80 добавляли 0,1 мл исследуемого раствора, 0,2 мл раствора сульфата железа (II) концентрацией 1 ммоль, 0,2 мл раствора аскорбиновой кислоты концентрацией 10 ммоль, плотно закупоривали

и инкубировали при температуре 40 °С в течение 48 ч. Затем в полученную смесь добавляли 1 мл 40%-го раствора ТХУ и вновь инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. После чего центрифугировали при 6 000 об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант в количестве 2 мл смешивали с 1 мл 0,25%-го раствора ТБК и инкубировали при температуре 100 °С в течение 15 мин. Затем пробы охлаждали и измеряли их оптическую плотность на фотоэлектроколориметре при длине волны 535 нм против дистиллированной воды. Расчет общей антиоксидантной активности проводили относительно контрольной пробы, для приготовления которой вместо опытного раствора добавляли эквивалентное количество дистиллированной воды:

$$ОАА(\%) = \frac{(E_k - E_o)}{E_k} 100;$$

где E_k — оптическая плотность в контроле; E_o — оптическая плотность опытной пробы.

Общую прооксидантную активность (ОПА) оценивали по способности арбутина и гидрохинона индуцировать окисление твин-80 [7]. Для этого к 2 мл 1%-го раствора твин-80 добавляли 0,2 мл исследуемого раствора, плотно закупоривали и инкубировали при температуре 40 °С в течение 48 ч. Затем к полученной смеси добавляли 1 мл 40%-го раствора ТХУ и вновь инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. После этого пробы центрифугировали при 6 000 об/мин в течение 15 мин. Полученный супернатант в количестве 2 мл смешивали с 1 мл 0,25%-го раствора ТБК. Смесь инкубировали при температуре 100 °С в течение 15 мин и после охлаждения измеряли оптическую плотность на фотоэлектроколориметре при длине волны 535 нм против дистиллированной воды. Расчет общей прооксидантной активности (%) проводили относительно контрольной пробы, для приготовления которой вместо опытного раствора использовали эквивалентное количество дистиллированной воды:

$$ОПА = \frac{(E_o - E_k)}{E_o} 100;$$

где E_k — оптическая плотность в контроле; E_o — оптическая плотность опытной пробы.

Аналогично определяли ОАА и ОПА гидрохинона.

Результаты обрабатывали статистическим методом вариационных рядов Стьюдента с использованием программы Biostat для Windows.

Результаты

Результаты проведенных экспериментов показали, что в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л гидрохинон проявляет выраженную антиоксидантную активность, подавляя Fe^{2+} /аскорбатиндуцированное окисление твин-80 на 78,3% (таблица). Как видно из таблицы, последнее реализуется в увеличении показателя ОАА. Интересно, что в той же концентрации общую прооксидантную активность модельной системы гидрохинон стимулирует незначительно. Заметим, что показатель ОАА гидрохинона в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л был в 5 раз выше показателя ОПА в этой же его концентрации. Увеличение же концентрации раствора до $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л сопровождалось падением общей антиоксидантной активности гидрохинона в 2,3 раза и увеличением ОПА в 2,8 раза. Это, в свою очередь, устранило разницу между значениями ОАА и ОПА.

Антиоксидантный эффект арбутина *in vitro* оказался не столь выраженным. Так, ОАА арбутина в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л был выше по сравнению с концентрацией $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л в 2 раза, а ОПА возростала в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л в 1,6 раза по сравнению с концентрацией $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. При этом в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л арбутин проявлял одинаковые про- и антиоксидантные эффекты. А вот в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л показатель ОПА арбутина возрастал, превышая значения ОАА в 2,5 раза.

И, наконец, сравнение антиоксидантной активности гидрохинона и арбутина показало, что показатель ОАА гидрохинона в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л в 1,7 раза выше, чем таковой у арбутина в той же концентрации. Однако в этих же концентрациях ОПА арбутина превышала данный показатель гидрохинона в 2,4 раза. В концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л ОАА гидрохинона также превышала аналогичный показатель арбутина в 1,5 раза и, напротив, ОПА гидрохинона была достоверно ниже такового показателя арбутина в 1,4 раза.

Обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что арбутин и гидрохинон проявляют как антиоксидантные, так и прооксидантные свойства в эксперименте *in vitro*. При этом в данных экспериментальных условиях значительно преобладала антиоксидантная активность гидрохинона в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Возможно, выявленные различия в эффектах арбутина и гидрохинона обусловлены особенностями их химической структуры. Известно, что арбутин является фенологликозидом и имеет в молекуле один фенольный гидроксил. Гидрохинон же при наличии двух фенольных гидроксильных групп активнее связывает Fe^{2+} , препятствуя тем самым образованию свободных радикалов под действием Fe^{2+} /аскорбатиндуцированного окисления твин-80. Понятно, что в таком случае антиоксидантная активность гидрохинона будет выше.

Прооксидантные свойства изучаемых молекул, по всей видимости, также связаны с наличием в структуре фенольных гидроксильных групп. Следует отметить, что прооксидантный эффект для обоих исследуемых веществ был более выражен в концентрациях $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Возможно, это объясняется тем, что в случае, когда эффективная концентрация антиоксиданта мала относительно концентрации зарождающихся свободных радикалов, большая часть молекул антиоксиданта быстро превращается в феноксильные радикалы, которые способны с относительно высокой скоростью включаться в продолжение цепей реакций перекисного окисления липидов. В этом случае антиоксидант будет выступать не как ингибитор, а как субстрат реакций свободнорадикального окисления [8].

Интересно, что, сравнивая данные эксперимента *in vitro* с ранее полученными результатами оксидантной и антиоксидантной активности в опытах на крысах в условиях формалинового воспаления [4], можно отметить схожую картину поведения арбутина и гидрохинона в крови крыс и *in vitro* в концентрации

Показатели свободнорадикального окисления гидрохинона и арбутина *in vitro*

Гидрохинон				Арбутин			
ОАА, %		ОПА, %		ОАА, %		ОПА, %	
$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-3}$
$n = 12$	$n = 12$	$n = 12$	$n = 10$	$n = 12$	$n = 11$	$n = 11$	$n = 12$
$78,3 \pm 1,01$	$33,8 \pm 2,26^*$	$15,2 \pm 1,34$	$42,2 \pm 3,15^*$	<u>$44,3 \pm 3,09$</u>	<u>$22,8 \pm 2,59^*$</u>	<u>$37,0 \pm 5,72$</u>	<u>$57,8 \pm 3,64^*$</u>

Примечание. n — количество экспериментов; звездочками обозначены достоверные изменения ($p < 0,01$) показателей ОАА и ОПА каждого вещества в разной концентрации, подчеркнутые цифры отражают достоверные изменения показателей арбутина и гидрохинона в одинаковых концентрациях между собой.

$1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Это дает возможность предполагать, что исследуемые вещества реализуют свое действие на окислительно-антиокислительную систему по схожему механизму как в живом организме, так и *in vitro*.

Заключение

Таким образом, при сравнении антиокислительных и проокислительных свойств арбутина и гидрохинона *in vitro* установлено, что в разных концентрациях влияние исследуемых веществ на процессы СРО неодинаково. В концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л данные препараты проявляют в основном проокислительное действие, причем у арбутина оно более выражено, а в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л преобладает антиокислительный эффект, при этом он значительно выше у гидрохинона.

Сравнительный анализ показателей окислительно-антиокислительной системы в экспериментах *in vivo* и *in vitro* позволяет предполагать схожий механизм действия изучаемых веществ в пробирке и в живом организме.

Литература

1. Антонова Н.А. Редокс-свойства и антиокислительная активность соединений, содержащих фрагмент пространственно-затрудненного фенола: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Астрахань, 2010. 24 с.
2. Арбузова Я.С., Замятина С.В. Об антиокислительной активности растений семейства грушанковых и сборов, созданных на их основе // Окисление, окислительный стресс, антиокислители. Всероссийская конференция молодых ученых и II школа им. академика Н.М. Эмануэля. Доклады и тезисы. М.: Изд-во РУДН, 2006. С. 160—162.
3. Благородов С.В., Шелепов А.П., Дмитриева Н.А. и др. Метод определения антиокислительной способности и синтетические антиокислители в ряду производных оксазина и

- непредельных хлоркетонов // Тезисы II Всесоюзной конференции «Биоантиокислитель». Черноголовка, 1986. С. 28—29.
4. Брюханов В.М., Смирнов И.В., Бондарев А.А. и др. Влияние арбутина и гидрохинона на процессы свободно-радикального окисления в крови крыс // Биомедицина. 2011. № 1. С. 41—49.
 5. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М.: Высшая школа, 1989. 199 с.
 6. Второвина А.Н. Метод вольтамперометрии в определении антиокислительных свойств некоторых биологически активных соединений: автореф. дис. ... канд. хим. наук. Томск, 2008. 21 с.
 7. Галактионова А.П., Молчанов А.В., Ельчанинова С.А. и др. Состояние перекисного окисления у больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки // Клиническая и лабораторная диагностика. 1998. С. 11—14.
 8. Зайцев В.Г. Модельные системы перекисного окисления липидов и их применение для оценки антиокислительного действия лекарственных препаратов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Волгоград, 2001. 23 с.
 9. Замятина С.В., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф. и др. Влияние некоторых сборов из лекарственных растений Алтайского края на процессы свободно-радикального окисления в эксперименте // Юбилейный сборник научных статей. Барнаул, 2005. С. 80—88.
 10. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Бутылин В.Ю., Горбеев Н.И. Свободнорадикальное окисление и антиокислительная терапия. Киев: Морион, 2004. 160 с.
 11. Куцук Р.В., Зузук Б.М., Недоступ А.Т., Пецко Т. Толокнянка обыкновенная *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. (аналитический обзор) // Провизор. 2003. № 18. Электронный ресурс. Режим доступа: <http://www.provisor.com.ua>.
 12. Frohne D. The urinary disinfectant effect of extract from leaves *uva ursi* // Planta Med. 1970. № 18. P. 1—25.
 13. Matsuda H., Tanaka T., Kubo M. Pharmacological study sheet *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. III. A combined effect of arbutin and indomethacin on immuno-inflammation // Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan. 1991. V. 111 (4—5). P. 253—258.

Поступила в редакцию 10.04.2011 г.

Утверждена к печати 01.06.2011 г.

Сведения об авторах

Н.А. Волобой — преподаватель кафедры фармакогнозии и ботаники АГМУ (г. Барнаул).

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

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

О.С. Талалаева — канд. мед. наук, ассистент кафедры фармакологии АГМУ (г. Барнаул).

С.В. Замятина — канд. мед. наук, ассистент кафедры фармакологии АГМУ (г. Барнаул).

О.Н. Зяблова — преподаватель кафедры фармакогнозии и ботаники АГМУ (г. Барнаул).

И.В. Смирнов — канд. мед. наук, доцент кафедры фармакогнозии и ботаники АГМУ (г. Барнаул).

Для корреспонденции

Волобой Нина Леонидовна, тел. 8-923-720-7074; e-mail: voloboyn@gmail.com