

Антиоксидантное действие дигидрокверцетина в составе нового органолекарства селезенки

М.В.Заико¹, Ю.О.Теселкин², Л.А.Павлова^{1,3}, С.В.Козин¹

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, НИИ фармации, лаборатория биологически активных соединений (зав. лабораторией — доц. Л.А.Павлова);

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований, отдел медицинской биофизики, Москва (зав. отделом — проф. А.Н.Осипов);

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, кафедра организации фармацевтической деятельности фармацевтического факультета, Москва (зав. кафедрой — доц. Н.В.Иващенко)

Изучена способность дигидрокверцетина ингибировать развитие свободнорадикальных реакций в процессе хранения нового органолекарства «Спленактив» (СА), который представляет собой лиофильно высушенное водное извлечение из селезенки крупного рогатого скота. Органолекарство готовили без (СА-1) и с добавлением дигидрокверцетина в качестве антиоксиданта (СА-2). Антиоксидантную активность органолекарств, а также содержание в них продукта перекисного окисления липидов – малонового диальдегида – определяли до и после хранения в течение 2 лет. Обнаружено, что по истечении выбранного срока хранения антиоксидантная активность органолекарства СА-1 уменьшилась в 10 раз, а содержание в нем малонового диальдегида увеличилось в 2 раза по отношению к исходному уровню ($p < 0,01$), тогда как в случае органолекарства СА-2 соответствующие показатели практически не изменились. Таким образом, применение дигидрокверцетина в качестве антиоксиданта в составе органолекарства СА ингибирует развитие окислительных процессов и способствует увеличению его срока хранения.

Ключевые слова: органолекарство, перекисное окисление липидов, антиоксиданты, дигидрокверцетин, антиоксидантная активность, малоновый диальдегид

The Antioxidant Activity of Dihydroquercetin in the New Spleen Medication

M.V.Zaiko¹, Yu.O.Teselkin², L.A.Pavlova^{1,3}, S.V.Kosin¹

¹I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, Institute of Pharmacy, Laboratory of Bioactive Compounds

(Head of the Laboratory — Assoc. Prof. L.A.Pavlova);

²Pirogov Russian National Research Medical University, Institute for Fundamental and Applied Biomedical Research, Department of Medical Biophysics, Moscow (Head of the Department — Prof. A.N.Osipov);

³Pirogov Russian National Research Medical University, Department of Organization of Pharmaceutical Activity of Pharmaceutical Faculty, Moscow (Head of the Department — Assoc. Prof. N.V.Ivashchenko)

In the study the ability of dihydroquercetin to inhibit the development of free radical reactions in the process of storing a new animal extracted product «Splenaktiv» (SA), which is a freeze-dried aqueous extract of the cattle spleen, was investigated. SA was prepared without (SA-1) and with dihydroquercetin supplement as an antioxidant (SA-2). The antioxidant activity of SA-1 and SA-2 and the content of lipid peroxidation product – malondialdehyde – were determined before and after storage for 2 years. It was found that after the period of storage of the selected antioxidant activity of the animal extracted product SA-1 decreased by 10 times, and the content of malondialdehyde increased by 2 times as compared to baseline ($p < 0.01$), whereas in the case of SA-2 the appropriate parameters practically did not change. Thus, the use of dihydroquercetin as an antioxidant in the composition of SA inhibits the development of oxidation processes and increases its shelf-life.

Key words: animal extracted product, lipid peroxidation, antioxidants, dihydroquercetin, antioxidant activity, malondialdehyde

Среди лекарственных препаратов органолекарства занимают особое место. Они обладают высокой биологической активностью, избирательностью действия и при этом сравнительно малотоксичны [1, 2]. Для пригото-

вления органолекарств (фетальных органолекарств-ревитализаторов), как правило, используются экстракты стволовых или зрелых клеток плодных органов и тканей здоровых животных [1, 2].

Особого внимания заслуживают препараты, созданные на основе ткани селезенки животных. Благодаря высокому содержанию различных биологически активных веществ, они успешно применяются в комплексном лечении иммунодефицитных состояний, а также шизофрении, диабета, туберкулеза, токсикозов на ранних сроках беременности, различных форм гепатита и некоторых видов опухолей [3].

Одним из таких препаратов является обладающий иммуномодулирующими свойствами «Спленопид», разработанный А.Б.Цыпиным [3–5]. Нами была усовершенствована технология приготовления этого препарата, что привело к созданию нового препарата, имеющего рабочее название «Спленактив» (СА). Указанный препарат представляет собой комплекс биологически активных веществ, выделенных из селезенки крупного рогатого скота. Предварительное фармакологическое изучение СА показало его иммуностимулирующую активность [6]. Так, например, *in vitro* СА в значительной степени повышал синтез цитокинов лейкоцитами донорской крови, а также бактерицидную активность и поглотительную функцию нейтрофилов. При изучении состава СА методами высокоэффективной жидкостной хроматографии, электрофореза и иммуноферментного анализа были обнаружены три белковые фракции с молекулярными массами более 13 кДа, а также идентифицированы основные типы цитокинов: провоспалительные, противовоспалительные и регуляторные [7].

Вопрос о защите органопрепаратов от автоокисления является весьма актуальным, поскольку развитие окислительных процессов может привести не только к уменьшению срока хранения органопрепарата, но и к потере его биологической активности. В качестве наиболее перспективных антиоксидантов следует рассматривать вещества природного, например, растительного происхождения, поскольку они, как правило, менее токсичны для организма человека, чем синтетические антиоксиданты.

К числу таких антиоксидантов относится дигидрохверцетин (ДГК), богатым сырьем для промышленного получения которого служит древесина лиственницы [8]. В настоящее время ДГК входит в состав многих лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище. Он применяется в комплексном лечении авитаминоза, атеросклероза, сахарного диабета, бронхолегочных, сердечно-сосудистых и глазных заболеваний [8, 9]. Показано, что ДГК оказывает положительное влияние на функциональное состояние печени, способствует восстановлению дренажной функции бронхов и биомеханики дыхания, улучшает работу сердца, обладает капилляропротекторной и противоотечной активностью, активирует процессы регенерации слизистой желудка, оказывает гепатопротекторное и радиопротекторное действие, проявляет гиполипидемические и

диуретические свойства [8–10]. Установлено, что ДГК обладает антиоксидантными свойствами [8, 11, 12], которые, по-видимому, лежат в основе многих наблюдаемых *in vivo* биологических эффектов этого флавоноидного соединения. В связи с этим для защиты от процесса автоокисления разрабатываемого нами нового иммуномодулирующего органопрепарата СА был выбран ДГК.

Цель работы — исследовать способность ДГК ингибировать развитие свободнорадикальных реакций в органопрепарате СА в процессе его хранения.

Материалы и методы

В работе использовали две партии органопрепарата СА (по 10 образцов в каждой), приготовленного путем лиофильного высушивания водного извлечения из селезенки крупного рогатого скота. Первая партия органопрепарата была приготовлена без антиоксиданта (СА-1), вторую партию готовили с ДГК (СА-2). Для этого 4 мл раствора ДГК в этаноле (250 мг/мл) добавляли к 1 л водного экстракта селезенки при постоянном перемешивании с последующей лиофилизацией. В органопрепарат СА-1 в качестве контроля добавляли только этанол. Содержание ДГК в органопрепарате СА-2 составляло 28 мг на 1 г сухого вещества. Органопрепараты хранили в течение 2 лет при температуре +4 °С в сухом, защищенном от света месте. Антиоксидантную активность (АОА) органопрепаратов и содержание в них малонового диальдегида (МДА) — водорастворимого продукта перексидного окисления липидов (ПОЛ) — определяли непосредственно после их приготовления (5 образцов) и по окончании периода хранения (5 образцов), предварительно растворяя их в изотоническом растворе хлорида натрия до концентрации 34,4 мг/мл.

Для измерения АОА органопрепаратов использовали модельную систему, в которой окисление люминола индуцировали водорастворимыми пероксильными радикалами, образующимися при термическом разложении 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (АБАП) [13]. За процессом окисления люминола наблюдали с помощью регистрации его хемилюминесценции (ХЛ). Реакционная среда имела следующий состав: 50 мкМ люминола, 1 мМ АБАП в 0,1 М Трис-НСl буфере, содержащем 0,1 М КCl и 1 мМ ЭДТА, pH 8,0. Исследуемые образцы органопрепаратов, а также тролокс, который использовали в качестве антиоксиданта сравнения, добавляли в реакционную среду после достижения стационарного уровня кинетики ХЛ — примерно через 15 мин после инициирования окисления люминола с помощью АБАП. АОА органопрепаратов рассчитывали исходя из продолжительности наблюдаемого латентного периода свечения и выражали в микромолях тролокса на 1 г сухого вещества («тролоксовый эквивалент» АОА) [13]. Измерение ХЛ люминола проводили на хемилюминометре ХЛМ-3 (ООО «Бикап», Москва) при постоянном перемешивании и температуре +37 °С.

Об интенсивности реакций ПОЛ в органопрепаратах судили по содержанию в них МДА, которое определяли спектрофотометрически по реакции с тиобарбитуровой кислотой [14] и выражали в наномолях МДА на 1 г сухого вещества.

Для корреспонденции:

Заико Марина Валерьевна, аспирант лаборатории биологически активных соединений НИИ фармации Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М.Сеченова

Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Телефон: (495) 708-3971

E-mail: marina.zaiko@rambler.ru

Статья поступила: 27.01.2014, принята к печати 20.02.2014

Результаты исследования были обработаны стандартными методами вариационной статистики и представлены как средняя величина \pm стандартная ошибка средней ($M \pm m$).

Результаты исследования и их обсуждение

На рисунке показано влияние изучаемых органолекарств, а также тролокса на латентный период ХЛ люминола, индуцированной добавлением АБАП. Видно (рисунок, а), что с увеличением содержания органолекарства СА-1 в модельной системе латентный период увеличи-

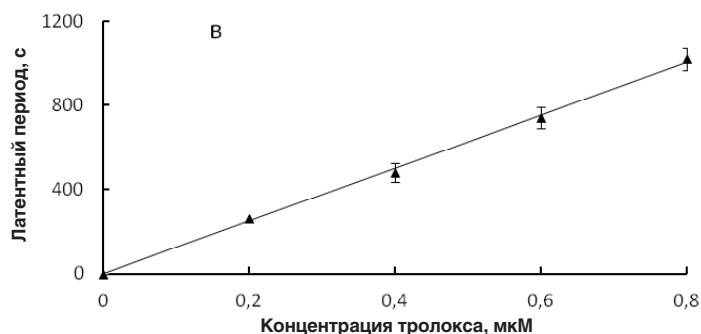
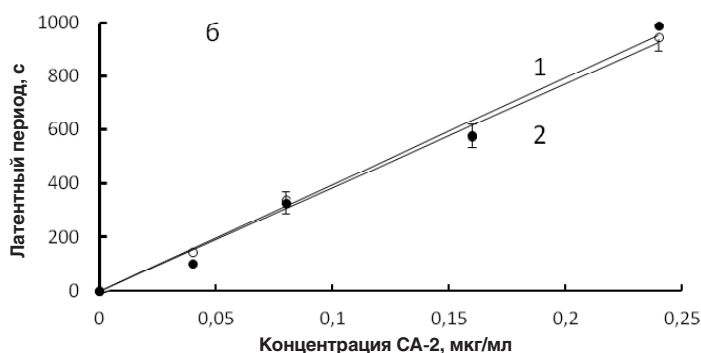
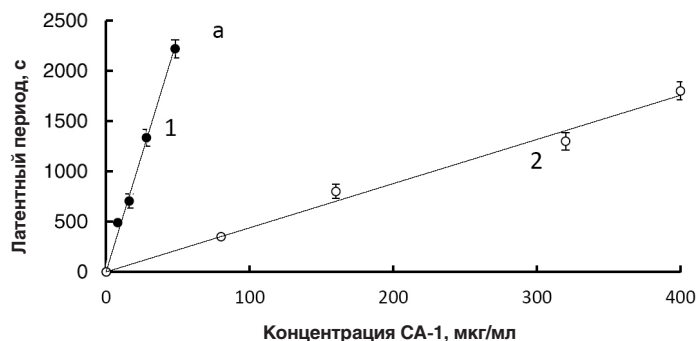


Рисунок. Изменение латентного периода ХЛ люминола, индуцированной с помощью АБАП, в присутствии органолекарств СА-1 (а), СА-2 (б) и тролокса (в). 1 – до хранения органолекарств; 2 – после хранения органолекарств в течение 2 лет.

вался прямо пропорционально. Это можно объяснить ингибирующим влиянием на окисление люминола антиоксидантов, присутствующих в составе органолекарства и перехватывающих пероксильные радикалы. Известно, что именно по такому механизму действует тролокс [16], использованный в настоящем исследовании в качестве антиоксиданта сравнения (рисунок, в). В то же время следует отметить, что тангенс угла наклона прямой, соответствующей органолекарству СА-1 до хранения, был значительно больше тангенса угла наклона прямой, которая соответствует органолекарству СА-1 после его хранения в течение 2 лет. Это свидетельствует о том, что радикалперехватывающая способность исходного органолекарства СА-1 была выше таковой по истечении срока хранения.

При добавлении в модельную систему органолекарства СА-2 (рисунок, б) наблюдаемые зависимости изменения латентного периода от концентрации органолекарства также носили линейный характер. Однако в отличие от СА-1 влияние СА-2 на латентный период окисления люминола оставалось прежним и после хранения этого органолекарства в течение 2 лет.

На основании результатов, представленных на рисунке, были рассчитаны значения АОА изучаемых органолекарств (таблица). Из таблицы видно, что исходное значение АОА органолекарства СА-2 было в 87 раз больше, чем таковое органолекарства СА-1 ($p < 0,01$). После хранения АОА органолекарства СА-2 практически не изменилась, тогда как АОА органолекарства СА-1 уменьшилась в 10 раз по отношению к исходному уровню ($p < 0,01$). Полученный результат, по-видимому, связан с тем, что в процессе хранения органолекарства СА-1 происходит активация свободнорадикальных реакций. Это приводит к окислению содержащихся в нем различных биологических субстратов, в том числе антиоксидантов, и, соответственно, к уменьшению латентного периода ХЛ люминола, индуцированной АБАП. В то же время ДГК, присутствующий в органолекарстве СА-2, защищает входящие в его состав биологически активные вещества от свободнорадикального окисления, поэтому существенного изменения антиоксидантных свойств этого органолекарства за исследованный интервал времени хранения не наблюдается.

Одним из индикаторов интенсивности свободнорадикальных реакций в изучаемых органолекарствах может служить уровень процесса ПОЛ, экстракция которых происходит одновременно с экстракцией различных белок-липидных комплексов клеток селезенки. Об уровне процесса ПОЛ в органолекарствах судили по содержанию в них МДА (см. таблицу). Исходно содержание МДА в обоих органолекарствах не различалось. После хранения в те-

Таблица. АОА изучаемых органолекарств и содержание в них МДА ($M \pm m$)

Органолекарство	АОА, мкмоль/г		МДА, нмоль/г	
	исходно	после 2 лет хранения	исходно	после 2 лет хранения
СА-1	36,0 \pm 1,7	3,5 \pm 0,2**	2,24 \pm 0,01	4,47 \pm 0,01**
СА-2	3158,7 \pm 157,9	3078,2 \pm 153,9	2,23 \pm 0,01	2,46 \pm 0,01*

* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ по отношению к исходному значению соответствующего показателя

ние 2 лет содержание МДА в органопрепарате СА-1 увеличилось в 2,0 раза, а в органопрепарате СА-2 только в 1,1 раза по отношению к исходному уровню ($p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно). Таким образом, ДГК практически полностью ингибирует развитие реакций ПОЛ в процессе хранения органопрепарата СА-2.

Механизм ингибирования свободнорадикальных реакций, в том числе реакций ПОЛ, в присутствии ДГК может быть различным. Известно, что ДГК обладает способностью взаимодействовать с липидными радикалами [11, 16] и активными формами кислорода, например гидроксильными и супероксидными радикалами [12], а также хелатировать ионы металлов переходной валентности [11, 17]. Результаты, полученные в нашем исследовании, показывают, что ДГК эффективно защищает органопрепарат СА, приготовленный из селезенки крупного рогатого скота, от процесса липидной перекисидации. Все это, с учетом низкой токсичности ДГК, а также доступности сырьевой базы, создает хорошие перспективы для его использования в качестве антиоксиданта при создании новых органопрепаратов.

Выводы

1. АОА нового органопрепарата из селезенки крупного рогатого скота «Спленактив» с добавкой ДГК не изменяется при хранении в течение 2 лет, тогда как АОА органопрепарата без ДГК уменьшается в 10 раз по отношению к исходному уровню ($p < 0,01$).

2. Содержание МДА в органопрепарате «Спленактив» с добавкой ДГК после 2 лет хранения увеличивается в 1,1 раза ($p < 0,05$), в то время как в препарате без ДГК возрастает в 2 раза по сравнению с исходным содержанием ($p < 0,01$).

Литература

1. Ролик И.С. Фетальные органопрепараты. Клиническое применение. М.: РегБиоМед, 2003. 736 с.
2. Сиденко Л.Н., Андриюкова Л.Н. Органопрепараты в офтальмологии и ринологии: состояние и перспективы // ФАРМАКОМ. 2004. №2. С.1–7.
3. Цыпин А.Б. Препарат Спленопид – новый перспективный иммуномодулятор // Медицинская картотека. 2004. №11. С.22–23.
4. Цыпин А.Б., Онищенко Н.А., Мануйлов Б.А. и др. Разработка, получение и некоторые свойства нового иммуномодулятора пептидной природы // Иммунология. 1995. №1. С.33–36.
5. Патент 2245174, Российская Федерация, А 61 К 35/28, А 61 К 38/02, А 61 К 47/42, А 61 Р 31/00, А 61 Р 37/02. Способ получения лекарственного препарата иммуномодулятора для лечения тяжелых форм гнойно-септических и аутоиммунных заболеваний / Патентообладатель Цыпин А.Б.; Онищенко Н.А.; Иванов И.М. № 2012118016/15; заявл. 03.05.12; опубл. 10.09.13, Бюл. №25. 10 с.
6. Заико М.В., Козин С.В., Павлова Л.Н. и др. Новый иммуностимулирующий лекарственный препарат из селезенки свиньи // Сеченовский вестник. 2013. Т.11. №1. С.74.
7. Заико М.В., Павлова Л.А., Козин С.В. и др. Изучение состава нового органопрепарата из селезенки свиней методом высокоэффективной хроматографии и электрофоретического анализа // Бутлеровские сообщения. 2012. Т.32. №11. С.61–63.
8. Плотников М.Б., Тюкавкина Н.А., Плотникова Т.М. Лекарственные препараты на основе диквертина. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2005. 228 с.
9. Каражаева М.И., Саксонова Е.О., Клебанов Г.И. и др. Применение флавоноидных антиоксидантов в комплексном лечении больных с периферическими витреохориоидальными дистрофиями и дистрофической отслойкой сетчатки // Вестн. офтальмол. 2004. №4. С.14–18.
10. Уминский А.А., Хавстеин Б.Х., Баканева В.Ф. Биохимия флавоноидов и их значение. Пушино: ООО «Фотон-век», 2007. 264 с.
11. Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О., Ребров Л.Б. и др. Механизм ингибирующего действия дигидрохверцетина на процесс перекисидного окисления фосфолипидов мембран // Биомед. технол. и радиоэлектрон. 2003. №6. С.37–43.
12. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и антиоксиданты. Минск: БГУ, 2004. 174 с.
13. Чехани Н.Р., Теселкин Ю.О., Павлова Л.А. и др. Антиоксидантная активность растений, используемых в этномедицине Тувы // Вестн. РГМУ. 2012. №6. С.66–69.
14. Куликова А.И., Тугушева Ф.А., Зубина И.М., Шепилова И.Н. Методические аспекты оценки потенциальной способности липидов к перекисидлению по уровню ТБК-активных продуктов сыворотки крови при стимуляции ионами железа // Клин. лаб. диагност. 2008. №5. С. 8–10.
15. Drech M.T.K., Rossato S., Kappel V.D. et al. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential // Anal Biochem. 2009. V.385 (1). P.107–114.
16. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Демин Е.М. Дигидрохверцетин (таксифолин) и другие флавоноиды как ингибиторы образования свободных радикалов на ключевых стадиях апоптоза // Биохимия. 2009. Т.74. №3. С.372–379.
17. Шаталин Ю.В., Шмарев А.Н. Окисление лецитина в присутствии дигидрохверцетина и его комплекса с ионами двухвалентного железа // Биофизика. 2010. Т.55. №1. С.75–82.

Информация об авторах:

Теселкин Юрий Олегович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела медицинской биофизики НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-8192
E-mail: teselkin-box@mail.ru

Павлова Людмила Анатольевна, кандидат фармацевтических наук, доцент, заведующая лабораторией биологически активных соединений НИИ фармациии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М.Сеченова, доцент кафедры организации фармацевтической деятельности фармацевтического факультета Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2
Телефон: (495) 708-3971
E-mail: l-a-pavlova@yandex.ru

Козин Сергей Валерьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологически активных соединений НИИ фармациии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М.Сеченова
Адрес: 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2
Телефон: (495) 708-3971
E-mail: enfadado@yandex.ru