

УДК 678.048+612.015

О. А. МАКАРЕНКО, канд. биол. наук, зав. лаб. биохимии,
А. П. ЛЕВИЦКИЙ, проф., д-р биол. наук, зам. директора по науч. работе,
В. И. ЛИТВИНЕНКО¹, проф., д-р хим. наук, гл. науч. сотр. лаб. химии и
технологии биополимеров,
И. В. ХОДАКОВ, науч. сотр. лаб. биохимии
ГУ «Институт стоматологии АМН Украины», лаборатория биохимии,
ул. Ришельевская, 11, Одесса, 65026, Украина,
тел.: +38 (048) 728-24-63, e-mail: flavan@mail.ru
¹ ГП «Государственный научный центр лекарственных средств и медицинской
продукции», ул. Астрономическая, 33, Харьков, 61085, Украина,
тел.: +38 (057) 720-02-58, e-mail: Litvinenko@GNCLS Kharkov.ua

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ПРИРОДНЫХ БИОФЛАВАНОИДОВ

Проведены исследования антиоксидантной активности биофлаваноидов, полученных из растительного сырья в модельных системах *in vitro*. Байкалин выделен из корней шлемника байкальского, софорикозид — из плодов софоры японской, флаволигнаны — из плодов расторопши пятнистой. Установлена наиболее высокая антиоксидантная активность байкалина, более чем в 2 раза превышающая этот показатель у стандарта рутин. Антиоксидантные свойства байкалина проявляются за счет высокой антирадикальной и хелатирующей, софорикозида — антисупероксидной и хелатирующей, а флаволигнанов расторопши — антирадикальной эффективности.

Ключевые слова: биофлаваноиды, антиоксидантная активность, модели *in vitro*.

Синдром пероксидации носит универсальный характер при всех видах стресса, а также патогенных воздействиях эндо- и экзогенного характера. Поэтому поиск источников и разработка препаратов на основе активных антиоксидантов остается актуальной проблемой для современной медицины, фармакологии и биологии.

Иницируются процессы пероксидации активными формами кислорода (АФК). Продукция супероксидрадикала O_2^{\bullet} , гидроксилрадикала OH^{\bullet} , пероксидного радикала ROO^{\bullet} являются неотъемлемой частью процессов аэробного метаболизма клетки. O_2^{\bullet} и OH^{\bullet} инициируют цепную реакцию перекисного окисления липидов (ПОЛ), которая катализируется ионами переходных металлов. Этим путем окисляются ненасыщенные жирные кислоты, что может быть причиной нарушения целостности и свойств биологических мембран [1, 2, 3].

Образование АФК и продуктов ПОЛ регламентируется системой антиоксидантной защиты, при недостаточной эффективности которой наблюдается гиперпродукция АФК и развитие окислительного стресса. Интенсивность окислительного стресса зависит также от обеспеченности организма экзогенными антиоксидантами, в том числе и биофлаваноидами (БФ). Антиоксидантная активность является одним из ключевых биологических свойств БФ и проявляется в способности тормозить развитие синдрома пероксидации на различных этапах [3, 4, 5]. В связи с этим большинство авторов склонны объяснять широкий спектр лечебно-профилактической активности растительных препаратов антиоксидантными свойствами БФ, входящих в их состав.

Целью предлагаемой работы явилось исследование антиоксидантных свойств биофлаваноидов байкалина, софорикозида и флаволигнанов в модельных системах *in vitro*. Антисупероксидную активность исследовали в системе образования O_2^{\bullet} ; антирадикальную — в реакции с радикалом дифенилпикрилгидразилом (OH^{\bullet}), антиокислительную — в реакции окисления твина-80 (продукты ПОЛ) и хелатирующую — по способности связывать ионы Fe^{2+} . Препаратом сравнения служил синтетический рутин («Sigma», USA).

Материалы и методы

В работе исследовали биофлаваноиды, выделенные и очищенные из растительного сырья. Байкалин или 7-0- β -D-глюкуронопиранозид 5.6.7-тригидроксифлавонол получили из корней шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi.), как описано в работах [6, 7]. Качество вещества соответствует требованиям ВФС 42У-115/37-275-96. Софорикозид или 4'-0- β -D-глюкопиранозид 5.7.4'-тригидроксиизофлавонола выделен и очищен из плодов софоры японской (*Sophora japonica* L.), как описано в работе [8]. Флаволигнаны (*Sylibum marianum* L. Gaerth) или смесь эфиров кониферилового спирта с таксифолином или 3.5.7.3'.4'-пентагидроксифлавононом получили из плодов расторопши пятнистой (*Sylibum marianum* L. Gaerth), как описано в работах [9, 10]. Качество субстанции соответствует требованиям АНД № 678-2005 фармацевтической компании «Здоровье» (г. Харьков).

Общую антиокислительную активность выделенных БФ оценивали по степени ингибирования БФ аскорбат- и ферроиндуцированного окисления твина-80 до малонового диальдегида (МДА), содержание которого определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой [11]. Антисупероксидную активность определяли по способности БФ конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) в реакции восстановления супероксидных радикалов, образованных в системе «феназинметасульфат — NADH» [12]. Антирадикальную активность определяли по способности БФ отдавать подвижный атом водорода радикалу дифенилпикрилгидразилу (ДФПГ) [13]. Хелатирующую активность БФ оценивали по их способности связывать ионы Fe^{2+} , количество которых определяли с помощью феррозина [14].

Измерение оптической плотности во всех случаях осуществляли на спектрофотометре UV mini-1240 Shimadzu (Япония) и проводили в нескольких концентрациях БФ, каждая в трех повторностях. Антиоксидантную активность БФ оценивали по степени ингибирования вышеперечисленных процессов (ИА), выражали в % и рассчитывали по формуле

$$ИА = \frac{E_k - E_{оп}}{E_k} \cdot 100,$$

где E_k — оптическая плотность контроля без БФ; $E_{оп}$ — оптическая плотность в присутствии исследуемого БФ; 100 — перевод в % [14].

Для оценки антиоксидантной активности БФ использовали показатель IC_{50} , который равен концентрации препарата, оказывающей 50%-е ингибирование в каждой модельной системе. Значения IC_{50} определяли с использованием уравнений регрессии, описывающих зависимость доза-эффект, которые рассчитывали по исходным точкам с помощью регрессионного анализа с использованием программы MS Excel и выражали в молярной концентрации (М) [15]. Приемлемыми считали регрессии с коэффициентом детерминации R^2 не ниже 0,95.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены результаты расчетов концентраций изучаемых БФ, оказывающих 50%-й ингибирующий эффект в модельной системе образования супероксидадикала. Наиболее активное ингибирующее действие в этой системе оказал софорикозид, IC_{50} которого в 2,65 раза выше, чем стандарта рутина. В порядке увеличения IC_{50} , а значит снижения антисупероксидной эффективности, расположен байкалин (IC_{50} в 3,28 раза выше, чем рутина) и флаволигнаны расторопши (IC_{50} в 4,35 раза выше, чем рутина).

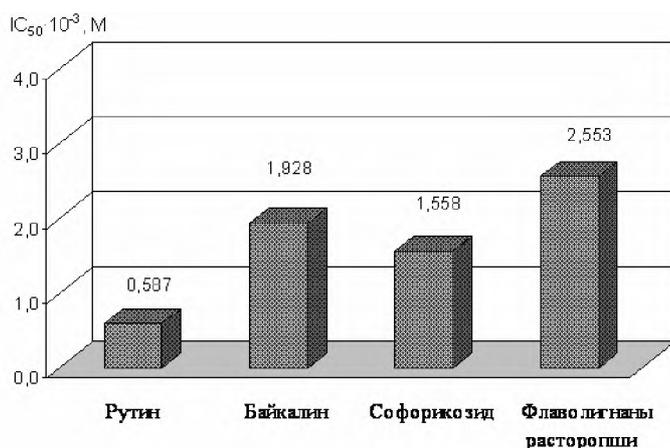


Рис. 1. Антисупероксидная активность биофлаваноидов

По способности восстанавливать OH^{\bullet} в реакции с дифенилпикрилгидразилом байкалин сопоставим с рутином, поскольку их IC_{50} почти одинаковы (рис. 2). Флаволигнаны расторопши по сравнению с рутином обладают гораздо более низкой антирадикальной активностью (IC_{50} в 50,5 раза выше). Самая низкая антирадикальная эффективность среди изучаемых БФ установлена для софорикозида, IC_{50} которого на два порядка выше, чем рутина и байкалина.

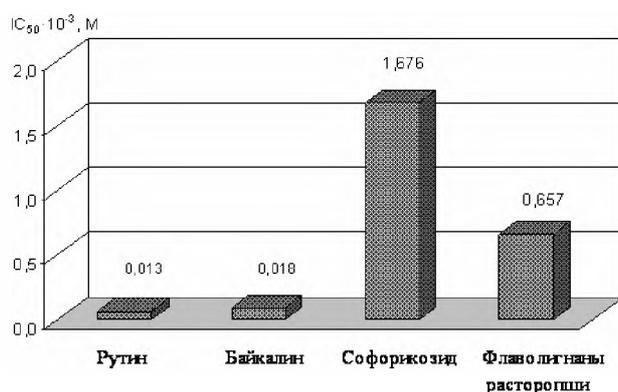


Рис. 2. Антирадикальная активность биофлаваноидов

Хелатирующая активность БФ, которую оценивали по степени связывания ионов Fe^{2+} , наиболее высока у байкалина, IC_{50} которого примерно равна таковой

рутина. IC_{50} софорикозида в 22,89 раза выше по сравнению с рутином, а флаволигнанов расторопши — почти в 70 раз (рис. 3).

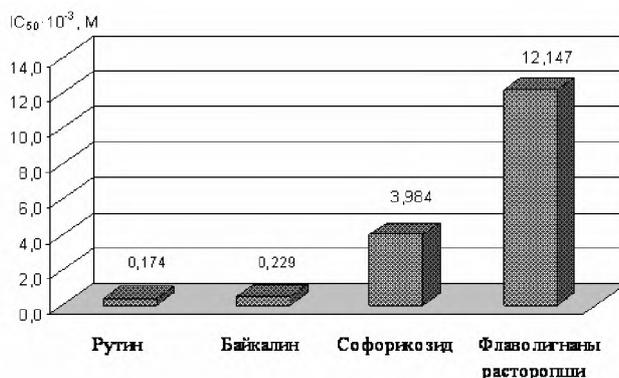


Рис. 3. Хелатирующая активность биофлаваноидов

Как показано на рис. 4, отражающем антиокислительную активность изучаемых препаратов, самый низкий показатель IC_{50} среди этих БФ имеет байкалин, полученный из корней шлемника байкальского. IC_{50} байкалина в этой модельной системе в 2,16 раза ниже, чем у рутина, что означает более высокую способность байкалина тормозить образование МДА. Далее в порядке увеличения IC_{50} расположен препарат флаволигнанов расторопши и самый высокий показатель IC_{50} — у софорикозида.

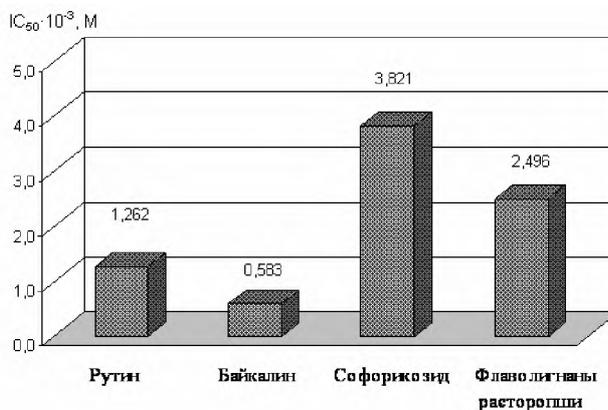
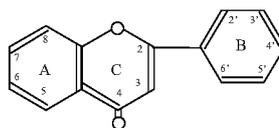


Рис. 4. Антиокислительная активность биофлаваноидов

Степень антиоксидантной активности биофлаваноидов многие авторы объясняют наличием и количеством в их структуре гидроксильных групп, отдающих подвижный атом водорода при взаимодействии с O_2^{\bullet} , OH^{\bullet} и ROO^{\bullet} . В этом случае БФ выступают в роли «ловушек» свободных радикалов и перекисей липидов, превращаясь в малоактивные соединения [3, 5, 16]. Общая структура БФ такова:



Исследование показало неоднозначное направление антиоксидантной активности изученных БФ. Так, высокая антиоксидантная активность байкалина реализуется за счет выраженной способности связывать гидроксилрадикалы (OH^\bullet) и ионы Fe^{2+} . В данных случаях активность этого биофлавоноида сопоставима с синтетическим рутином. При этом антисупероксидная активность (O_2^\bullet) байкалина и софорикозида в несколько раз ниже, чем рутина. В структуре байкалина имеется два свободных фенольных гидроксила (у С-5 и С-6), у рутина — четыре (у С-5, С-7, С-3' и С-4'), а у софорикозида — два фенольных гидроксила (у С-5 и С-7). Флаволигнаны расторопши представлены композицией из нескольких соединений (силибин, силидианин, силикрестин, силандрин), имеющих в молекуле два—три гидроксила (у С-3, С-5 и С-7). Наши результаты подтвердили существующее мнение о том, что способность флавоноидов связывать O_2^\bullet зависит от количества свободных гидроксильных групп в их молекуле.

Высокую антирадикальную активность байкалина (сопоставимую с рутином) можно объяснить расположением фенольного гидроксила у С-6, а не у С-7, как в молекулах софорикозида и флаволигнанов расторопши. Последние два препарата оказались менее активными по сравнению с рутином и байкалином и в различных модельных системах оказывали неоднозначное антиоксидантное действие. Так, софорикозид проявлял более выраженную способность тормозить образование O_2^\bullet и связывать ионы Fe^{2+} , чем флаволигнаны. Наряду с этим флаволигнаны расторопши более активно, по сравнению с софорикозидом, подавляли образование МДА и восстанавливали OH^\bullet -радикалы.

Хелатирующая способность изучаемых препаратов связана не только с количеством и расположением фенольных гидроксильных групп, но, скорее всего, с общей конформацией молекулы БФ. Различная степень выраженности антирадикальных, антисупероксиданионных и хелатирующих свойств изученных БФ отражается в конечном итоге на способности тормозить образование МДА.

Таким образом, проведенное исследование показало, что выделенные БФ являются активными антиоксидантами, способными на разных этапах образования АФК и продуктов ПОЛ тормозить эти процессы. Наиболее активным среди изученных препаратов оказался байкалин, антиоксидантная эффективность которого сопоставима с синтетическим рутином и реализуется за счет высокой антирадикальной и хелатирующей активности. Софорикозид проявляет антиоксидантные свойства благодаря выраженной способности связывать супероксиданион и ионы Fe^{2+} . Активность композиции флаволигнанов расторопши реализуется за счет высокой антирадикальной эффективности [16].

Выводы

1. Байкалин среди изученных биофлавоноидов обладает наиболее выраженной способностью предотвращать окисление твина-80 до МДА. Антиоксидантная активность байкалина более чем в 2 раза превышает таковую у стандарта рутина.

2. Антиоксидантные свойства байкалина проявляются за счет высокой антирадикальной и хелатирующей, софорикозида — антисупероксидной и хелатирующей, а флаволигнанов расторопши — антирадикальной эффективности.

Литература

1. *Воейков В. Л.* Активные формы кислорода — патогены или целители? // Клиническая геронтология. — 2003. — Т. 9, № 3. — С. 27—40.
2. *Сазонтова Т. Г., Архипенко Ю. В.* Значение баланса прооксидантов и антиокси-

дантов — равнозначных участников метаболизма // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2007. — № 3. — С. 2—18.

3. *Потапович А. И., Костюк В. А.* Сравнительное исследование антиоксидантных свойств и цитопротекторной активности флаваноидов // Биохимия. — 2003. — Т. 68, вып. 5. — С. 632—638.

4. *Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.* The effect of plant flavonoides on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer // Pharmacological Review. — 2000. — Vol. 52, № 4. — P. 673—701.

5. *Andersen O. M., Markham K. R.* Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Application. — CRC Press, 2005. — 1256 p.

6. *Шлемник байкальский.* Фитохимия и фармакологические свойства / Е. Д. Гольдберг, А. М. Дыгай, В. И. Литвиненко, Т. П. Попова и др. — Томск: Изд-во Томского унта, 1994. — 223 с.

7. *Фитохимия* и фармакологические свойства препаратов шлемника байкальского / В. И. Литвиненко, Т. П. Попова, В. Г. Воловик, Е. Д. Гольдберг и др. — Х., 2007. — 763 с.

8. *Саилова Д. Д., Попова Т. П., Литвиненко В. И.* Флавоноиды наземной части софоры японской флоры Азербайджана // Фармаком. — 1996. — № 1/2. — С. 36—38.

9. *Сокольская Т. А.* Создание лекарственных средств из плодов расторопши пятнистой (получение, стандартизация и контроль качества): Автореф. дис. ... д-ра фармацевт. наук. — М., 2000. — 79 с.

10. *Зубченко Т. Н.* Розробка і стандартизація виробництва препаратів на основі комплексної переробки розторопші плямистої: Дис. ... канд. фармацевт. наук. — Х., 2008. — 157 с.

11. *Горячковский А. М.* Определение общей антиоксидантной активности плазмы и эритроцитов. В кн.: Клінічна біохімія в лабораторній діагностиці: Довідковий посібник. — Вид. 3-те, вип. і доп. — Одеса: Екологія, 2005. — С. 379—380.

12. *Чевари С., Чаба И., Секей И.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее активности в биологических материалах // Лаб. дело. — 1985. — № 11. — С. 678—681.

13. *Антирадикальная* и антиокислительная активность некоторых мембранотропных препаратов синтетического и растительного происхождения / Губский Ю. И., Юрженко Н. Н., Шаповал Н. Н. и др. // Укр. биохим. журнал. — 1998. — Т. 70, № 3. — С. 128—134.

14. *Nadaromlu H., Demir Y., Demir N.* Antioxidant and radical scavenging properties of *Iris Germanica* // Химико-фарм. журнал. — 2007. — Т. 41, № 8. — С. 13—18.

15. *Сернов Л. Н., Гацура В. В.* Элементы экспериментальной фармакологии. — М., 2000. — С. 117—119.

16. *Куркин В. А.* Расторопша пятнистая — источник лекарственных средств (обзор) // Химико-фарм. журнал. — 2003. — Т. 37, № 4. — С. 27—41.

О. А. Макаренко, А. П. Левицкий, В. И. Литвиненко¹, И. В. Ходаков

ДУ «Інститут стоматології АМН України», лабораторія біохімії,

вул. Рішельєвська, 11, Одеса, 65026, Україна,

тел.: +38 (048) 728-24-63, e-mail: stomat@paso.net

¹ ДП «Державний науковий центр лікарських засобів і медичної продукції»,

вул. Астрономічна, 33, Харків, 61085, Україна, тел.: +38 (057) 720-02-58,

e-mail: Litvinenko@GNCLS Kharkov.ua

АНТИОКСИДАНТНІ ВЛАСТИВОСТІ ДЕЯКИХ ПРИРОДНИХ БІОФЛАВАНОЇДІВ

Резюме

Проведені дослідження антиоксидантної активності біофлаваноїдів, що виділили з рослинної сировини в модельних системах *in vitro*. Байкалін отримали з коріння шлемника байкальського, софорікозід — з плодів софори японської і флаволігнани — з пло-

дів розторопши плямистої. Встановлена найбільш висока активність байкаліна, що більш ніж в 2 рази перевищує стандарт рутин за цим показником. Антиоксидантні властивості байкаліна виявляються за рахунок високої антирадикальної і хелатуючої, софорокозиди — антисупероксидної і хелатуючої, а флаволігнанів розторопши — антирадикальної дії.

Ключові слова: біофлаваноїди, антиоксидантна активність, моделі *in vitro*.

O. A. Makarenko, A. P. Levitsky, V. I. Litvinenko¹, I. V. Khodakov
SE «The Institute of Dentistry of the AMS of Ukraine», the laboratory of Biochemistry,
Rishelievskaya str., 11, Odessa, 65026, Ukraine,
phone: +38 (048) 728-24-63; e-mail: stomat@paco.net
¹ SE «State Scientific Centre of the Medicaments and Medical Production»,
Astronomichnaya str., 33, Kharkov, 61085, Ukraine,
phone: +38 (057) 720-02-58, e-mail: Litvinenko@GNCLS Kharkov.ua

THE ANTIOXIDANT CHARACTERISTICS OF SOME NATURAL BIOFLAVANOIDS

Summary

The reseachs of the antioxidantive activity of bioflavanoids extracted from vegetative raw materials, in the simulated systems *in vitro* was conducted. Baicalin was isolated from the roots of *Scutellaria baicalensis*, sophoricoside — from the fruits of *Sophora japonica*, flavolignans — from the fruits of *Sylibum marimum*. The highest antioxidant activity of baicalin is determined. It exceeds more than a twice the same index of rutin standard. The antioxidant properties of baicalin are displayed due to high antiradical and chelatic efficiencies, some properties of sophoricoside — due to antisuperoxidat and chelatic efficiencies, some properties of flavolignans of *S. marimum* — due to antiradical efficiency.

Key words: bioflavanoids, antioxidant activity, models *in vitro*.
