

УДК 615.32:616-03.9

DOI: 10.14427/jipai.2018.2.32

Антиоксидантная активность природных флавоноидов и их производных

Р.Б. Сейдахметова, М.А. Романова, Г.К. Мукушева, Т.С. Сейтеметбетов, С.М. Адекенов

АО «Международный научно – производственный холдинг «Фитохимия», лаборатория фармакологии, Караганда, Республика Казахстан

Antioxidant activity of natural flavonoids and their derivatives

R.B. Seidakhmetova, M.A. Romanova, G.K. Mukusheva, T.S. Seitembetov, S.M. Adekenov

Joint-stock company "International Research and Production Holding "Phytochemistry", Laboratory of pharmacology, Karaganda, Republic of Kazakhstan

Аннотация

Проведен скрининг на антиоксидантную активность в ряду фенольных соединений. Исследование проводилось на перевиваемой клеточной культуре крысиной гепатомы (НТС), с использованием флуоресцентного зонда ДХФДА. Вещества, обладающие антиоксидантным потенциалом, в частности флавоноиды дибромпроизводное пиностробина, пиноцембрин, артемизетин могут оказывать антиоксидантное действие на клеточной культуре гепатомы НТС, снижая интенсивность флуоресценции зонда на активные формы кислорода при инкубации их с клетками в течение 48 часов. Природные флавоноиды с антиоксидантной активностью представляют интерес для фармакологических исследований.

Ключевые слова

Антиоксидантное действие, природные соединения, фенольные соединения, скрининг веществ

Введение

Причинами проявления сердечно-сосудистых, желудочно-кишечных, злокачественных опухолей и других заболеваний является накопление в организме излишних концентраций свободных радикалов. Для урегулирования концентрации радикалов в живых организмах вырабатываются специальные вещества - различные ферменты, витамины, обладающие антиоксидантными свойствами. Такие соединения являются ловушкой для свободных радикалов. Естественно, что для профилактики вышеуказанных заболеваний рекомендуются лекарства с содержанием анти-

Summary

A series of phenolic compounds has been screened for antioxidant activity. The study was carried out on a transplantable rat hepatoma (HTC) cell line using DCFDA fluorescent probe. Compounds with antioxidant potential, namely dibromo derivatives of flavonoid pinostrobin, pinocembrin and artemisinin, can exert antioxidant effect on the HTC hepatoma cell line reducing the fluorescence intensity of the probe on reactive oxygen species (ROS) when incubating them with cells for 48 hours. Natural flavonoids with antioxidant activity are of interest for pharmacological investigations.

Keywords

Antioxidant action, natural compounds, phenolic compounds, screening of substances

оксидантов, в частности, растительного происхождения [1-3].

Набор антиоксидантов в растениях гораздо богаче, чем в тканях животных и человека. Это объясняется тем, что растения практически не имеют никаких других средств защиты от агрессивного воздействия окружающей среды. На сегодняшний день известно около 6000 антиоксидантов растительного происхождения [4, 5].

Широкие перспективы для разработки оригинальных лекарственных препаратов антиоксидантного действия представляют флавоноиды. В экспериментальных и биологических системах

флавоноиды проявляют антирадикальную и антиоксидантную активность [6].

Цель настоящей работы - оценить антиоксидантную активность образцов фенольных соединений в экспериментах *in vitro* на клеточной культуре гепатомы линии НТС по их способности ингибировать образование активных форм кислорода в клетках при стимуляции свободнорадикального окисления проксидантом H_2O_2 .

Материалы и методы

В качестве объектов исследования выбраны фенольные соединения и их производные: апигенин (1), цирсилеол (2), пиноцембрин (3), дибромпроизводное пиностробина (4), артемизетин (5).

Исследование антиоксидантной активности образцов выполнено в экспериментах *in vitro* на перевиваемой клеточной культуре крысиной гепатомы (НТС) полученной из Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург).

Для исследования *in vitro* влияния образцов на продукцию активных форм кислорода в культуре гепатомы НТС с использованием флуоресцентного зонда ДХФДА предварительно проводили оценку жизнеспособности клеток при инкубации их в среде с концентрациями 1, 5, и 10 мкМ исследуемых соединений. Жизнеспособность клеток оценивали МТТ-тестом.

Уровень активных форм кислорода в клетках гепатомы исследовали с помощью флуоресцентного зонда – 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина диацетата (ДХФДА) [7].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программы «Statistica 6,0». Полученные результаты представлены в виде «среднее значение±стандартная ошибка среднего значения». Межгрупповые отличия оценивали непараметрическим критерием Mann-Whitney U-test. Для попарно связанных групп использовали непараметрический критерий Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования влияния образцов фенольных соединений: апигенин (1), цирсилеол (2), пиноцембрин(3), дибромпроизводное пиностробина (4) и артемизетин (5) на жизнеспособность клеток гепатомы линии НТС представлены в таблице 1.

Установлено, что все исследуемые образцы в концентрациях 1 и 5 мкМ не влияли на жизнеспособность клеток гепатомы линии НТС, в более высоких концентрациях они оказывали цитотоксическое действие на культуру. Поэтому, для дальнейшего исследования антиоксидантных свойств, образцы брали в конечной концентрации 5 мкМ.

Таблица 1. Влияние флавоноидов на жизнеспособность клеточной культуры гепатомы линии НТС оцениваемую с применением МТТ-теста

Название образцов	Концентрация образцов (мкМ)	Количество живых клеток в % от контроля
Контроль		100 ± 1,93
Апигенин (1)	1	107,7± 1,93
	5	111,5± 1,93
	10	0
Цирсилеол (2)	1	109,2± 1,93
	5	108,0± 1,93
	10	16,2± 1,93
Пиноцембрин(3)	1	113,8± 1,93
	5	116,1± 1,93
	10	0
Дибромпроизводное пиностробина (4)	1	110,4± 1,93
	5	109,6± 1,93
	10	33,8± 1,93
Артемизетин (5)	1	122,1± 1,93
	5	104,2± 1,93
	10	65,9± 1,93

Примечание: жизнеспособность клеток в контроле принимали за 100 %.

Результаты по исследованию влияния испытываемых образцов на интенсивность флуоресценции зонда ДХФДА в клеточной культуре гепатомы линии НТС представлены в таблице 2.

В результате экспериментов установлено, что инкубация клеток гепатомы НТС в течение 48 часов с флавоноидами дибромпроизводным пиностробина (4), пиноцембрином (3) и артемизетином (5) в конечной концентрации 5 мкМ, приводит к снижению флуоресценции ДХФ на 28%, 21,9%, 19,8% соответственно (табл. 2). Флавоноиды апигенин (1) и цирсильнеол (2) не

оказывали влияния на уровень активных форм кислорода в клеточной культуре.

Добавление прооксиданта H_2O_2 (0,5 мМ) в культуру клеток крысиной гепатомы НТС вызывает повышение интенсивности флуоресценции в 4,2 раза ($p < 0,05$). В клетках, которые предварительно инкубировались с исследуемыми образцами интенсивность флуоресценции при добавлении H_2O_2 уменьшалась только в присутствии в инкубационной среде флавоноидов дибромпроизводного пиностробина, пиноцембрина, артемизетина на 14,9%, 14,8% и 15,8% соответственно (табл. 3).

Таблица 2 – Влияние флавоноидов на интенсивность флуоресценции 2,7-дихлоридигидрофлуоресцеина в клеточной культуре крысиной гепатомы НТС

Название образцов	Ед. флуоресценции	% от контроля
Контроль	63,8±6,2	100,0±9,7
Апигенин (1)	66,8	104,7
Цирсильнеол (2)	66,1	103,7
Пиноцембрин (3)	49,8	78,1
Дибромпроизводное пиностробина (4)	45,9	72,0
Артемизетин (5)	51,2	80,2

Таблица 3 – Влияние флавоноидов и гидропероксида водорода на интенсивность флуоресценции 2,7-дихлоридигидрофлуоресцеина в клеточной культуре крысиной гепатомы НТС

Название образцов	Ед. флуоресценции	% от контроля
Контроль	63,8±6,2	
Контроль+ H_2O_2 (0,5мМ)	266,5±46,3	100,0±17,4
Апигенин (1)	296,5	111,3
Цирсильнеол (2)	351,8	132,0
Пиноцембрин (3)	227,1	85,2
Дибромпроизводное пиностробина (4)	226,9	85,1
Артемизетин (5)	224,5	84,2

Заключение

В результате проведенных исследований выявлено, что флавоноиды дибромпроизводное пиностробина (4), пиноцембрин (3), артемизетин (5) могут оказывать антиоксидантное действие на клеточной культуре гепатомы НТС, снижая интенсивность флуоресценции зонда на активные формы кислорода при инкубации их с клетками в течение 48 часов. Образцы дибромпроизводное пиностробина (4), пиноцембрин (3), артемизетин (5) также снижают уровень АФК в клетках гепатомы НТС при стимуляции окислительного стресса прооксидантом H_2O_2 (0,5мМ).

Остальные исследуемые образцы флавоноидов – апигенин (1) и цирсильнеол (2) не сни-

жают интенсивность флуоресценции зонда на активные формы кислорода при инкубации их с клетками в течение 48 часов.

Таким образом, установленное антиоксидантное действие флавоноидов дибромпроизводное пиностробина, пиноцембрина и артемизетина в условиях *in vitro* позволяет сделать вывод о перспективности дальнейшего углубленного изучения указанных флавоноидов в плане поиска новых высокоэффективных антиоксидантов природного происхождения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки МОН РК по грантовому проекту AP05134907 на 2018-2020 годы

Литература

1. Kim H.P., Mani I., Ziboh V.A. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase from guinea pigs. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1998; 58: 17-24.
2. Marfak A., Trouillas P., Allais Redox reactions obtained by irradiation of quercetin methanol solution ar similar in vivo metabolism. *Radiat Res*. 2003; 159: 218-227.
3. Della Loggia R., Tubaro A., Sosa S. The role of triterpenoids in the topical anti - inflammantory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Plante Medica*. 1994; 60: 516-520.
4. Пепанян А.А. Использование антиоксидантов в косметологии. *Вестник мед. института им. Меграбяна*. 2007; 34-39.
5. Hanaski Y., Ogawa S., Fukui S. The correlation between oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free radic. Biol Med*. 1994; 8: 77-97.
6. Dugas A. J. Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *J. Nat. Prod*. 2000; 63: 3: 327-331.
7. Мартинович Г.Г. Утилизация пероксида водорода эпителиальными клетками амниона человека. *Биомедицинская химия*. 2005; 6: 626-633.

Сведения об авторах:

Сейдахметова Роза Батталовна – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией фармакологии, АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия». Караганда

Романова Мария Андреевна, – младший научный сотрудник лаборатории фармакологии, АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия». Караганда

Мукушева Гулим Кенесбековна – кандидат химических наук, заведующая лабораторией химии фенольных соединений АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия». Караганда.

Сейтембетов Талгат Султанович – доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории фармакологии, АО «Международный научно-производственный холдинг «Фитохимия». Караганда.

Адекенов Сергазы Мынжасарович – академик НАН РК, доктор химических наук, профессор, председатель правления АО «Международный научно-производственный холдинга «Фитохимия». Караганда. E-mail: phyto_pio@mail.ru.

Получена 03.05.2018 г.