

ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ИЗОФЛАВОНА — ГЕНИСТЕИН-8-С-ГЛИКОЗИДА *in vitro* И *in vivo*

Л. Б. Заводник¹, А. П. Шкодич^{1,3}, М. Вилянек², А. И. Егоров¹, И. Б. Заводник¹, Ю. В. Попов¹, В. А. Овчинников⁴, Н. А. Ламан³, В. У. Буко¹

Цель работы — изучение биологической активности изофлавоноидов генистеин-8-С-гликозида (Г8СГ), выделенного из бутонов люпина желтого, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* при однократном общем γ -облучении крыс. Г8СГ эффективно предотвращал образование продуктов перекисного окисления липидов и нарушение метаболизма глутатиона при окислительном стрессе, индуцированном в эритроцитах человека и гомогенатах печени крыс трет-бутилгидроперекисью и однократным общим облучением крыс в дозе 1 Гр. Препарат оказывал более выраженный глутатионсберегающий эффект по сравнению с кверцетином.

Ключевые слова: генистеин-8-С-гликозид, эритроциты, печень, глутатион, перекисное окисление липидов, ионизирующее излучение

ВВЕДЕНИЕ

Изофлавоны относятся к флавоноидам, классу растительных соединений фенольной природы, обладающих высокой биологической активностью [19]. Считается, что гликозиды изофлавонов обладают более высокой биологической активностью по сравнению с соответствующими агликонами [18]. Общее свойство всех флавоноидов — способность инактивировать свободные кислородные радикалы, модифицирующие клеточные структуры и инициирующие окислительные повреждения белков, липидов и ДНК в клетке [17].

Ранее мы продемонстрировали выраженные протекторные свойства генистеин-8-С-гликозида (Г8СГ) при окислительных процессах, индуцируемых в эритроцитах человека гипохлорной кислотой [1]. В настоящей работе продолжено изучение антиоксидантных свойств Г8СГ, изофлавоноида, выделенного из бутонов люпина желтого (*Lupinus luteus L.*), в условиях окислительного повреждения эритроцитов человека и гомогенатов печени крыс трет-бутилгидроперекисью (тБГП) *in vitro* и *in vivo* при однократном общем воздействии γ -излучения у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойную кислоту) (реактив Элмана), 2-тиобарбитуро-

вую кислоту (ТБК), трихлоруксусную кислоту, трет-бутилгидроперекись “Sigma-Aldrich Chemie GmbH” (Германия), трис-оксиметиламинометан — “Reanal” (Венгрия), кверцетин генистин и генистеин “Sigma” (США), остальные реактивы — аналитической градации (Россия).

Г8СГ изолировали из цветов люпина желтого (*Lupinus luteus L.*) по методу, описанному в работах [3, 4]. По структуре он представляет гликозилированный в 8 положении изофлавоноид генистеин (рис. 1). Собраный материал сушили в термостате при температуре 50 – 60 °С в течение 24 ч. Для получения суммарного экстракта фенольных соединений измельченный растительный материал трехкратно экстрагировали 70 % этанолом. Объединенные экстракты упаривали на вакуумном испарителе до объема 100 – 150 мл. Выпавший осадок балластных соединений отделяли. Исходный этанольный экстракт, а также водный экстракт после отделения осадка подвергали хроматографическому разделению на колонке, заполненной полиамидом (3 × 80 см), которую элюировали градиентом этанола в водно-этанольной смеси. Следующий этап выделения заключался в проведении кислотного гидролиза экстракта 10 % соляной кислотой. Оставшийся в водном растворе Г8СГ экстрагировали этилацетатом. Экстракцию водного раствора осуществляли 5 – 6 раз, добавляя этилацетат в отношении 1:1 по объему. Объединенные экстракты упаривали под вакуумом досуха. Оценку чистоты полученного препарата проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

ВЭЖХ осуществляли на аналитической колонке RP C18 (5 мкм размер пор, 250 × 4 мм, Hewlett Packard 1050). В качестве элюента использовали градиент от 0

¹ Лаборатория экспериментальной гепатологии (зав. — проф. В. У. Буко) Института биохимии НАН Беларуси, Гродно, 230017, БЛК-50; leuzavodnik@yandex.ru.

² Институт физиологии растений, Университет г. Лодзь, Польша.

³ Институт экспериментальной ботаники, Минск, Беларусь.

⁴ Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь.

Исследование антиоксидантных свойств изофлавона

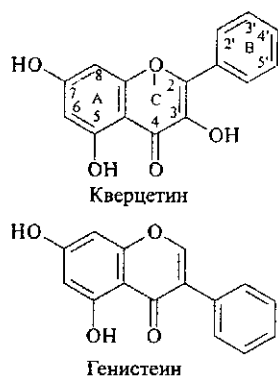


Рис. 1. Структурная формула кверцетина и генистеина. Генистеин-8-С-гликозид — гликозилированный в 8 положении генистеин.

до 80 % ацетонитрила в 0,1 % трифлуороуксусной кислоте. Для приготовления растворов использовали воду, очищенную с помощью системы Milli Q. Скорость потока через колонку 1,5 мл/мин, время протекания — 20 мин. Для определения веществ использовали UV детектор с длиной волны 262 нм. Все процедуры проводили при температуре 25 °С [10]. В качестве стандарта использовали генистеин (агликон) и генистин (гликозилированный генистеин). Проведенная процедура свидетельствует о 93 % чистоте выделенного препарата Г8СГ (рис. 2).

Эритроциты получали из крови здоровых доноров (с добавлением 3 % раствора цитрата натрия), промывали 3 раза холодным (4 °С) изотоническим раствором NaCl, содержащим фосфатный буфер (0,145 M NaCl; 1,9 mM NaH₂PO₄ и 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4). Суспензию эритроцитов (гематокрит 10 %) обрабатывали различными концентрациями тБГП в течение 20 мин при 22 °С (конечная концентрация 2 mM).

Кроме того, для исследования использовали гомогенаты печени крыс линии Вистар, массой 180–200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Перфузированную печень гомогенизировали в 1,15 % KCl (1:3, по массе). Процесс ПОЛ индуцировали добавлением тБГП (конечная концентрация 1 и 2 mM) при 22 °С и через 20 мин проводили соответствующие измерения.

Г8СГ вносили в инкубационную среду в конечной концентрации 1, 2 и 5 mM и инкубировали в течение 30 мин при 22 °С до внесения оксиданта. Для сравнения в опытах *in vitro* использовали эквимольные концентрации флавоноида кверцетина, относящийся к группе средств, обладающих Р-витаминной активностью [5]. Наряду с этим они известны своими антиоксидантными свойствами [5, 14].

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 150–200 г, содержащихся на стандартном рационе вивария. Для исследования влияния ионизирующего излучения *in vivo* на свободнорадикальные процессы и метаболизм глутатиона крыс подвергали однократно внешнему γ -облучения на уста-

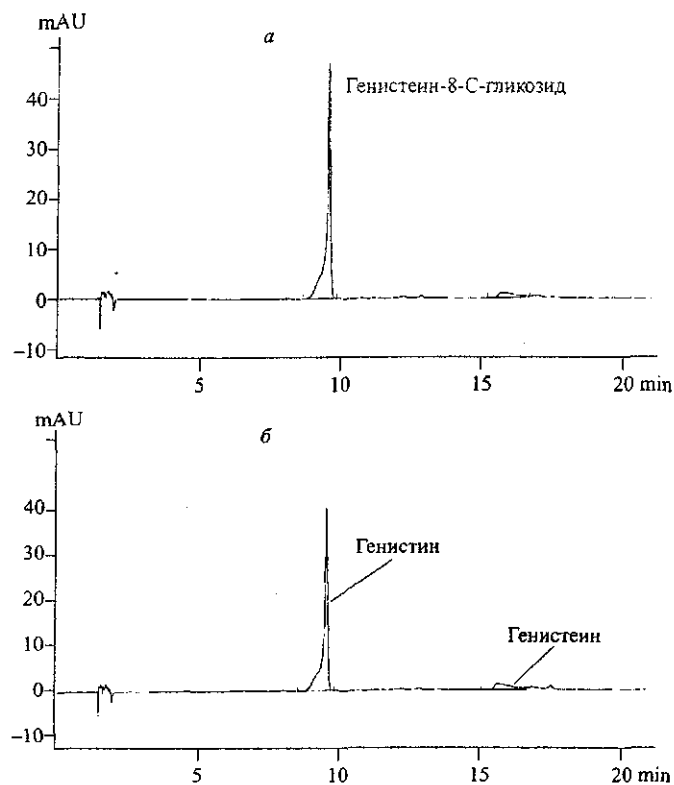


Рис. 2. Высокоэффективная жидкостная хроматография препарата генистеин-8-С-гликозида изолированного из цветов люпина желтого (*Lupinus luteus L.*) (а). В качестве стандарта использовали генистеин (агликон) и генистин (гликозилированный генистеин) (“Sigma”, США) (б).

новке для дистанционной терапии “АГАТ-С” (Россия) (источник излучения ⁶⁰Co, мощность дозы 88 сГр/мин, фокусное расстояние 30 см), исключая взаимную экранизацию животных.

Исследования проводили в следующих группах: I — контроль (без облучения); II — облучение (доза 1 Гр), однократно; III — облучение (доза 1 Гр) и введение Г8СГ внутрь, 75 мг/кг, 2 раза в день в течение всего эксперимента, начиная введение за 4 ч до облучения.

Через 1 или 3 дня после облучения животных декапитировали. Материалом для исследования служили сыворотка крови, гомогенат, микросомальная и цитозольная фракции печени крыс.

Микросомальную и цитозольную фракции печени выделяли дифференциальным центрифугированием постмитохондриального супернатанта на центрифуге VAC-602 Janetzki (Германия) по методу И. И. Карузиной и А. И. Арчакова [2]. Осадок ресуспендировали в 0,1 M трис-HCl буфере (pH 7,4) и разводили, в зависимости от целей опыта, до концентрации 0,5; 2 или 4 мг белка в 1 мл.

Содержание белка в пробе определяли по методу O. N. Lowry и соавт. [12].

Количество субстратов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБКРС), измеряли по общеприня-

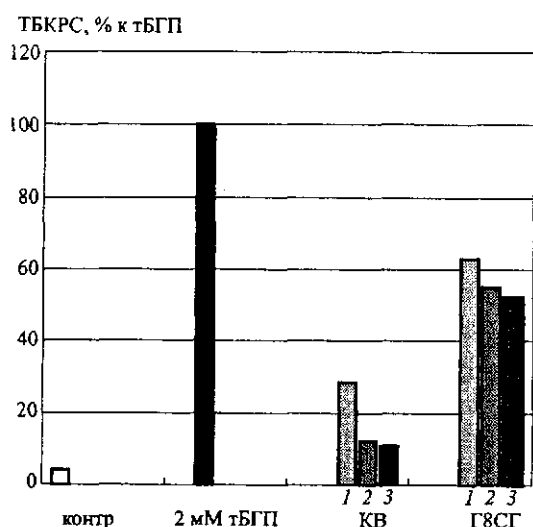


Рис. 3. Влияние генистеин-8-С-гликозида и кверцетина (конечная концентрация 1, 2 и 5 мМ, 30 мин преинкубации) на уровень ТБКРС (количество субстратов, реагирующих с биобарбитуровой кислотой) в суспензии эритроцитов после их обработки трет-бутилгидроперекисью, тБГП (22 °С, 20 минут).

Конечная концентрация: 1 – 1 мМ, 2 – 2 мМ, 3 – 5 мМ.

тому методу Stocks и Dormandy [16]. Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) определяли спектрофотометрически по методу Элмана, используя коэффициент экстинкции $13,6 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ (412 нм) [9].

Для изучения обмена глутатиона определяли активность глутатионпероксидазы [13], используя в качестве субстратов реакции трет-бутилгидроперекись (тБГП) и восстановленный глутатион (GSH), и активность глутатионредуктазы [6], измеряя скорость окисления НАДФН.

Результаты обрабатывали статистически с использованием непараметрического анализа по программе ANOVA. В опытах проводили не менее 6 параллельных измерений. Каждая группа состояла из 8 животных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В опытах на эритроцитах человека проводили сравнительный анализ антиоксидантных свойств Г8СГ и

кверцетина. Инкубация взвеси эритроцитов с 2 мМ тБГП в течение 20 мин вызывала окислительную модификацию клеток: 20-кратный рост уровня ТБКРС, полное окисление внутриклеточного восстановленного глутатиона и превращение $69 \pm 8\%$ гемоглобина в метформу (MetHb) (рис. 3). 30-минутная преинкубация клеток с 1, 2 и 5 мМ с Г8СГ до внесения окислителя снижала уровень ТБКРС в эритроцитарной взвеси на 37, 44 и 49 % соответственно, но не влияла на образование метгемоглобина и окисление GSH. Кверцетин в эквимоллярных концентрациях оказался более эффективным антиоксидантом, снижая уровень ТБКРС на 70–85 % (рис. 3). Защитного действия на GSH и MetHb обоих препаратов в этих условиях не выявлено.

Представленные в табл. 1 результаты исследований демонстрируют, что инкубация гомогената печени с 2 мМ тБГП вызывала 33 % рост уровня ТБКРС и почти полное исчезновение (снижение более чем на 90 %) восстановленного глутатиона. Преинкубация гомогената с Г8СГ в концентрациях 1, 2 и 5 мМ дозозависимо предотвращала наработку продуктов пероксидации липидов и снижение концентрации GSH. Кверцетин снижал рост ТБКРС более выражено, чем эквимоллярные концентрации Г8СГ, что составляло 22, 23 и 27 % к контролю соответственно. В то же время защитный эффект кверцетина по отношению к GSH был менее выражен, чем у Г8СГ (табл. 1).

Однократное внешнее γ -облучение крыс стимулирует процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в организме животных. Измерение уровня конечных продуктов ПОЛ выявило значительное возрастание их содержания после однократного облучения: через сутки уровень ТБКРС достоверно увеличивался в сыворотке крови (на 48 %) по сравнению с контрольными животными (табл. 2). Введение Г8СГ нормализовало уровень продуктов ПОЛ в сыворотке крови и гомогенате печени облученных животных уже через сутки. Через 72 ч наблюдения уровень ТБКРС после облучения и введения препаратов не отличался от контроля. Изменение показателей в микросомах печени между группами были недостоверны, хотя динамика сохраняла аналогичную тенденцию.

Таблица 1. Эффект генистеин-8-С-гликозида (Г8СГ) и кверцетина (30 мин) на индуцируемое тБГП (2 мМ, инкубация 20 мин, 22 °С) изменение ТБКРС и GSH в гомогенатах печени интактных крыс

Показатель	Контроль	тБГП, 2 мМ	Г8СГ			Кверцетин		
			1 мМ	2 мМ	5 мМ	1 мМ	2 мМ	5 мМ
GSH, нмоль/мг белка	23,1 ± 1,2	2,82 ± 0,16	6,26 ± 0,01	8,61 ± 0,94	12,2 ± 0,01	3,75 ± 0,29	4,38 ± 0,79	4,85 ± 0,16
% к контролю	100	9,7*	21,6* [#]	29,7* [#]	42,0* [#]	13* [@]	15* [@]	17* [@]
ТБКРС, нмоль/мг белка	0,522 ± 0,010	0,695 ± 0,047	0,522 ± 0,003	0,520 ± 0,013	0,362 ± 0,017	0,409 ± 0,035	0,406 ± 0,057	0,380 ± 0,010
% к контролю	100	133*	100 [#]	98 [@]	69* [@]	78* [@]	77* [@]	73* [@]

Примечание. Различия достоверны ($p < 0,05$) относительно: * — контроля; @ — тБГП; # — аналогичной концентрации кверцетина.

Исследование антиоксидантных свойств изофлавона

Однократное γ -облучение вызывает значительное нарушение обмена глутатиона в печени исследуемых животных: уровень GSH повышается через сутки после действия ионизирующего излучения в дозе 1 Гр на 26 % относительно контрольной группы (табл. 2). Глутатионредуктазная активность микросом значительно возрастает после облучения, в то время, как активность этого фермента в цитозольной фракции имеет тенденцию к снижению. Все показатели возвращались к контрольным через трое суток после однократного облучения (табл. 2).

Введение Г8СГ на фоне облучения нормализует уровень восстановленного глутатиона и уменьшает стимуляцию активности ферментов его обмена уже в первые сутки применения вещества (табл. 2). К 3-м суткам эксперимента система обмена глутатиона во всех исследуемых группах полностью нормализовалась.

Как свидетельствуют полученные результаты, Г8СГ оказывал выраженный антиоксидантный эффект в экспериментальных ситуациях *in vitro*. Его действие в модельных системах предполагает возможность прямого взаимодействия изофлавоноида со свободными радикалами.

В экспериментах *in vivo* однократное γ -облучение животных в дозе 1 Гр оказывает умеренный прооксидантный эффект, индуцируя образование продуктов ПОЛ в плазме крови и печени крыс, увеличивает уровень глутатиона в гепатоцитах и повышает активность ферментов антиоксидантной защиты. Г8СГ оказывает выраженный антиоксидантный эффект при однократном γ -облучении крыс. Аналогичное действие в различных тканях мышей, как показано ранее, оказала диета с высоким содержанием соевого генистеина [7].

Генистеин агликон, в отличие от своих структурных аналогов апигенина и биоханина А, способен ингибировать как продукцию супероксид-аниона [18], генерируемого в ксантин/ксантинооксидазной реакции, так и образование перекиси водорода [11], стимулированное 12-О-тетрадеканоилфорбол-13-ацетатом, что показано для клеток линии HL-60 лейкемии человека. Это приводит к прерыванию цепей ПОЛ и прекращению перекисных процессов в тканях. Генистеин в кон-

центрациях 1–25 мкг/мл снижал продукцию H_2O_2 нейтрофилами после стимуляции *n*-формилметионил-лейцил-фенилаланином [8].

При окислительном стрессе, индуцированном тБГП в модельных системах, Г8СГ, имеющий гидроксильную группу в положении 4', менее эффективно ингибировал процессы ПОЛ по сравнению с кверцетином, имеющим гидроксильные группы в положениях 3' и 4', однако более эффективно восстанавливал уровень глутатиона. Это подтверждает имеющиеся данные о том, что флавоноиды, имеющие гидроксильные группы в 3' и 4' позициях Б кольца и конъюгацию между кольцами А и В, имеют в 4 раза более выраженные противорадикальные свойства, чем остальные флавоноиды [14]. Обнаружен антиапоптотический эффект генистеина при X -облучении Reuber H35 клеток гепатомы [15]. Это объясняют способностью связывать свободные кислородные радикалы [14].

Полученные результаты указывают на новые фармакологические возможности изофлавоноидов, пригодные для коррекции различных видов патологии, сопровождающихся активацией свободнорадикальных процессов.

ВЫВОДЫ

1. Из цветков люпина желтого выделен изофлавоон генистеин-8-С-гликозид с высокой степенью очистки.
2. Генистеин-8-С-гликозид обладает более выраженными глутатионсберегающими свойствами в сравнении с антиоксидантом кверцетином в условиях окислительного стресса, вызванного трет-бутилгидроперекисью в гомогенатах печени крыс.
3. Генистеин-8-С-гликозид (75 мг/кг) в условиях однократного общего γ -облучения крыс снижает интенсивность процессов свободнорадикального окисления липидов и активизирует систему антирадикальной защиты.

Выражаем благодарность проф. М. Брышевой (кафедра общей биофизики Института биофизики Университета г. Лодзь, Польша) за представленные препараты генистеина и генистина и проф. Г. Урбанку (Институт физиологии Университета г. Лодзь, Польша).

Таблица 2. Коррекция генистеин-8-С-гликозидом (внутри, 75 мг/кг, 2 раза в сутки, начало введения за 4 ч до облучения) уровня ТБКРС и показателей обмена глутатиона в тканях крыс после однократного облучения (1 Грей, 24 ч)

Показатель	Контроль	Облучение	Облучение + Г8СГ
ТБКРС, нмоль/мг белка, микросомы	2,86 ± 0,31	3,31 ± 0,32 115,7 %	2,94 ± 0,18 102,8 %
ТБКРС, нмоль/мг белка, сыворотка	38,10 ± 2,28	56,5 ± 5,38 148,3 %*	35,9 ± 4,25 94,2% @
GSH, нмоль/мг белка, гомогенат	73,6 ± 5,3	92,9 ± 6,3 126,1 %*	71,9 ± 4,6 97,8 % @
GSH-пероксидаза, нмоль/мин/мг белка, цитозоль	362 ± 28	379 ± 31 104,5 %	363 ± 31 100,2 %
GSH-редуктаза, нмоль/мин/мг белка, микросомы	13,0 ± 1,1	16,7 ± 0,9 128,5 %*	16,2 ± 1,4 124,6 %
GSH-редуктаза, нмоль/мин/мг белка, цитозоль	81,2 ± 8,3	55,6 ± 3,4 68,7 % *	70,9 ± 3,4 86,3 %

Примечание. % — относительно контроля. Различия достоверны ($p < 0,05$): * — к соответствующему показателю у контрольных животных; @ — к группе облученных животных.

ша) за помощь в проведении анализа чистоты препарата Г8СГ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Б. Заводник, И. Б. Заводник, Е. А. Лапшина и др., *Биохимия*, **65**(8), 1114 – 1120 (2000).
2. И. И. Карузина, А. И. Арчаков, *Современные методы в биохимии*, В. Н. Ареховича (ред). Москва, Медицина (1977), сс. 49 – 61.
3. Н. А. Ламан, А. П. Вольнец, *Физиол. растений*, **21**, 737 – 745 (1984).
4. Н. А. Ламан, Л. П. Олексюк, *Известия АН БССР, сер. биол. Наук*, **1**, 101 – 103 (1982).
5. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства: В 2 т. Т 2. — 14-е изд., перераб.*, Москва, ООО “Издательства Новая Волна” (2002), сс. 86 – 87.
6. С. А. Хотимченко, И. А. Алексеева, Л. Г. Гвоздева, А. Н. Смирнова, *Сб. научн. трудов*, **8**, Москва (1987), сс. 107 – 109.
7. Q. Cai and H. Wei, *Nutr. Cancer*, **25**(1), 1 – 7 (1996).
8. C. M. Carreras, N. A. Riobo, G. A. Pargament, et al., *Free Rad. Res.*, **26**, 325 – 334 (1997).
9. G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70 – 77 (1959).
10. M. Fukutake, M. Takahashi, K. Ihida, et al. *Food and Chem. Toxicol.*, **34**, 458 – 463 (1996).
11. D. Gilles and H. Wei, *Nutrition and Cancer*, **29**, 77 – 82 (1997).
12. O. N. Lowry, N. G. Rosenbrough, and A. L. Farr, *J. Biol. Chem.*, **193**(1), 265 – 275 (1951).
13. J. I. R. Martinez, J. M. Launay, and C. Drex, *Anal. Biochem.*, **98**, 154 – 159 (1979).
14. C. A. Rice-Evance, N. J. Miller, and G. Paganga, *Trends in Plant Science*, **2**(4), 152 – 159 (1997).
15. J. van Rijn and J. van den Berg, *Clin. Cancer Res.*, **3**(10), 1775 – 1779 (1997).
16. J. Stocks and T. L. Dormandy, *Br. J. Haematol.*, **20**, 95 – 111 (1971).
17. S. Tahara and R. K. Ibrahim, *Phytochemistry*, **38**(5), 1073 – 1094 (1995).
18. M. Zielinska, A. Kostrzewa, E. Ignatowicz, and J. Budzianowski, *Acta biochim. Polonica*, **48**, 183 – 189 (2001).
19. H. Wei, R. Bowen, Q. Cai, et al., *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **202**, 124 – 130 (1995).

Поступила 29.11.04

ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF ISOFLAVON GENISTEINE-8-C-GLYCOSIDE IN VITRO AND IN VIVO

L. B. Zavodnik, A. P. Shkodich, M. Wielanek, A. I. Egorov, I. B. Zavodnik, Yu. V. Popov, V. A. Ovchinnikov, N. A. Laman, V. U. Buko

¹ Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Belarus, BLK-50, Grodno, 230017, Belarus, E-mail: val@bioc-hem.unibel.by

Bioflavonoids (polyhydroxyphenols) are ubiquitous components of plants, fruits and vegetables; these compounds are efficient scavengers of free oxygen radicals and peroxides. The aim of this study was to investigate the antioxidative effects of genistein-8-C-glycoside (G8CG) isolated from the flowers of *Lipinus luteus* L. G8CG dose-dependently inhibited membrane lipid peroxidation and prevented GSH oxidation in human red blood cells and rat liver homogenates under *tert*-butylhydroperoxide - induced oxidative stress and single whole-body γ -irradiation (1 Gy) of rats.