

А.А. Торопова ¹, Я.Г. Разуваева ¹, С.М. Николаев ^{1, 2}, А.В. Федоров ¹, З.Г. Самбуева ¹

АНТИОКСИДАНТНАЯ И МЕМБРАНОСТАБИЛИЗИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ *LOMATOGONIUM CARINTHIACUM* (WULF.) REICHENB. И *HYPECOUM ERECTUM* L. В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

¹ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН (Улан-Удэ)

² ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» (Улан-Удэ)

В представленной работе проведено исследование антиоксидантной и мембраностабилизирующей активности сухих экстрактов *Lomatogonium carinthiacum* (Wulf.) Reichenb. и *Hypocoum erectum* L. Установлено, что исследуемые экстракты оказывают антиоксидантное и мембраностабилизирующее действие, обусловленное способностью к инактивации активных форм кислорода и ингибированию перекисного окисления липидов.

Ключевые слова: *Lomatogonium carinthiacum*, *Hypocoum erectum*, экстракт, антиоксидантная активность, ДФПГ, супероксид-радикалы, оксид азота

IN VITRO ANTIOXIDANT AND MEMBRANE STABILITY ACTIVITIES OF EXTRACTS FROM *LOMATOGONIUM CARINTHIACUM* (WULF.) REICHENB. AND *HYPECOUM ERECTUM* L.

A.A. Toropova ¹, Ya.G. Razuvayeva ¹, S.M. Nikolayev ^{1, 2}, A.V. Fiodorov ², Z.G. Sambuyeva ¹

¹ Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude

² Buryat State University, Ulan-Ude

In the present study the antioxidant and membrane stability activities of *Lomatogonium carinthiacum* (Wulf.) Reichenb. and *Hypocoum erectum* L. extracts was determined using in vitro methods. It was found that the remedies shown expressed antioxidant and membrane stability activities as a result of inactivation of the reactive oxygen forms and inhibition of lipids peroxidation process.

Key words: *Lomatogonium carinthiacum*, *Hypocoum erectum*, extract, antioxidant activity, DPPH, superoxide-radicals, nitrogen oxide

В последнее время исследования патогенеза заболеваний печени, а также ряда других органов обогатились раскрытием молекулярных механизмов повреждения клеточных структур. Как известно, основным фактором их повреждения являются активные формы кислорода (АФК). При этом развивающийся окислительный стресс играет важную, если не ключевую, роль в патогенезе заболеваний печени. Содержание свободных радикалов и метаболитов свободных радикалов возрастает в условиях алкогольной интоксикации, при повреждении печени и воспалении (независимо от этиологии), дефиците антиоксидантов, гипоксии, воздействии некоторых лекарств. Поэтому вполне оправдан поиск новых подходов и средств подавления свободнорадикальных процессов и активации реакций антиоксидации [14, 15].

В связи с этим актуальным представляется применение фитопрепаратов в комплексной фармакотерапии заболеваний печени и желчевыводящих путей. Известно, что фитосредства обладают такими важными преимуществами, как малая токсичность, высокая эффективность, возможность длительного применения без побочных эффектов, а также их взаимозаменяемость [6]. В этом аспекте особый интерес представляют растения, применяемые в народной и традиционной медицине. В частности, в многовековой практике тибетской и монгольской медицины при лечении заболеваний

гепатобилиарной системы применяются ломатогониум каринтийский и гипекоум прямой.

Lomatogonium carinthiacum (Wulf.) Reichenb. содержит иридоиды, алкалоиды, флавоноиды, ксантоны [8, 17]. В тибетской и монгольской медицине *L. carinthiacum* применяется при остром и хроническом гепатите, болезнях желчного пузыря и желчевыводящих путей. Кроме того, готовые формы из данного сырья используются при дерматитах и различных инфекционных заболеваниях. В народной медицине готовые формы из *L. carinthiacum* применяются как возбуждающие аппетит и улучшающие пищеварение. Настой *L. carinthiacum* в экспериментах на животных оказывает диуретическое действие [5].

Hypocoum erectum L. содержит алкалоид гипекоцин, гипекоцинин, протопин, фумаритин, сангвинарин, синактин; каротиноиды [9]. Препараты *H. erectum* оказывают противовоспалительное, жаропонижающее и выраженное гипотензивное действие; обладают вирусо статическим, антибактериальными свойствами. В тибетской медицине, а также в Монголии и Сибири настой *H. erectum* применяется при инфекционных и онкологических заболеваниях, а также при заболеваниях зубов и слизистой полости рта [1].

Ранее в экспериментах была показана выраженная желчегонная активность указанных экстрактов [10, 11].

Целью настоящей работы явилось определение антиоксидантной и мембраностабилизирующей активности экстрактов сухих *Lomatogonium carinthiacum* (Wulf.) Reichenb. и *Hypocoum erectum* L. в модельных системах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экстракты получены из сырья, собранного в Тункинском районе Бурятии в 2010 г. Антирадикальную активность экстрактов определяли с применением DPPH-метода [16]. Влияние исследуемых средств на связывание супероксидных анион-радикалов ($O_2^{\cdot-}$) определяли в неэнзиматической системе феназин метосульфат / НАДН [15]; Fe^{2+} — хелатирующую активность определяли фенантролиновым методом [7]; связывание молекул оксида азота (NO) — по методу [13]. Для оценки влияния экстрактов на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) использовали модельную систему, состоящую из суспензии желточных липопротеидов (ЖЛП) [3].

Мембраностабилизирующую активность экстрактов определяли *in vitro* по степени торможения перекисного и осмотического гемолиза эритроцитов донорской крови [4]. Действие исследуемых фитосредств на гемолиз оценивали по сравнению с контролем (без их добавления в инкубационную среду). Полученные результаты подвергали логарифмированию по концентрационной шкале с последующим регрессионным анализом и определением величины 50 % ингибирования гемолиза эритроцитов на фоне введения указанных экстрактов (мг/мл) в инкубационную среду.

В качестве препаратов сравнения использовали кверцетин (Fluka) и аскорбиновую кислоту (Sigma). Спектрофотометрические исследования проб проводили на спектрофотометре CECIL 2011 (England) в кварцевых кюветках с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Корреляционный анализ данных проводили с применением пакета программ Advanced Grapher ver. 2.11 (Alentum Software Inc.), а статистическую обработку — согласно рекомендациям [2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В модельных системах *in vitro*, в которых происходит генерация свободных радикалов, сухой

экстракт *L. carinthiacum* проявляет умеренную антиоксидантную активность, а экстракт *H. erectum* оказывает выраженную антиоксидантную активность сопоставимую с таковой препарата сравнения — аскорбиновой кислотой (табл. 1).

В эксперименте показано, что исследуемые экстракты обладают антирадикальной активностью в отношении DPPH-радикала (ДФПГ-метод). Так, концентрация, при которой происходит 50 % ингибирование радикала (IC_{50}) составляет: *L. carinthiacum* — 65,01 мкг/мл, *H. erectum* — 97,12 мкг/мл, а для препаратов сравнения аскорбиновой кислоты и кверцетина данный показатель составил 4,81 и 9,90 мкг/мл, соответственно.

При изучении влияния указанных экстрактов на активные формы кислорода ($O_2^{\cdot-}$ и NO) и ионы Fe^{2+} установлено, что они обладают способностью к их инактивации (табл. 1). В эксперименте по определению хелатирования ионов Fe^{2+} IC_{50} для экстракта *L. carinthiacum* составляет 1100 мкг/мл. Для препарата сравнения — кверцетина данный показатель — > 5000 мкг/мл. Экстракт сухой *H. erectum* проявляет выраженную активность по связыванию ионов Fe^{2+} (IC_{50} = 180,00 мкг/мл), сопоставимую с таковой препарата сравнения — аскорбиновой кислотой (IC_{50} = 150,00 мкг/мл). По-видимому, Fe-хелатирующая активность *H. erectum* обусловлена наличием преимущественно в его химическом составе флавоноидов (производных рутина, изорамнетина) [9].

В отношении связывания супероксид-анион радикалов ($O_2^{\cdot-}$) характерна умеренная активность для сухого экстракта *L. carinthiacum* (IC_{50} = 422,50 мкг/мл), а сухой экстракт *H. erectum* характеризуется выраженной инактивирующей способностью в отношении $O_2^{\cdot-}$ -радикала (IC_{50} = 81,31 мкг/мл), превышающей активность аскорбиновой кислоты (IC_{50} = 101,00 мкг/мл).

Установлено, что исследуемые экстракты препятствуют накоплению ТБК-активных продуктов в модельной системе, защищая биологический субстрат от перекисного окисления липидов. IC_{50} для сухого экстракта *L. carinthiacum* составляет 346,00 мкг/мл (IC_{50} = 346,00 мкг/мл), для *H. erectum* — 85,00 мкг/мл (IC_{50} = 85,00 мкг/мл). В отношении связывания молекул NO, исследуемые экстракты проявляли умеренную активность. Так, для указанных экстрактов концентрация, при которой

Таблица 1
Антиоксидантная активность экстрактов сухих *Lomatogonium carinthiacum* и *Hypocoum erectum*

Объект	DPPH-метод, IC_{50} , мкг/мл	Fe^{2+} IC_{50} , мкг/мл	$O_2^{\cdot-}$ IC_{50} , мкг/мл	ЖЛП-метод IC_{50} , мкг/мл	NO IC_{50} , мкг/мл
<i>L. carinthiacum</i>	65,01 ± 1,97	1100,0 ± 12,01	422,50 ± 17,37	346,00 ± 11,21	> 5000
<i>H. erectum</i>	97,12 ± 2,34	180,00 ± 8,27	81,31 ± 3,19	85,00 ± 2,07	> 5000
Аскорбиновая кислота ⁶	4,81 ± 0,15	150,00 ± 0,01	101,00 ± 3,21	7,01 ± 0,25	1140,0 ± 34,21
Кверцетин ⁶	9,90 ± 0,21	> 5000	32,00 ± 1,12	12,07 ± 0,92	150,00 ± 4,15

Примечание: DPPH — антирадикальная активность в отношении ДФПГ-радикала, Fe^{2+} — Fe^{2+} -хелатирующая активность, $O_2^{\cdot-}$ — связывание супероксид-анион радикала, ЖЛП-метод — антиоксидантная активность в отношении накопления ТБК-активных продуктов, NO — связывание молекул оксида азота (II); ⁶ — вещество сравнения.

Таблица 2

Мембраностабилизирующая активность сухих экстрактов *Lomatogonium carinthiacum* и *Hypochaeris erectum*

Условия опыта	Дозы, мг/мл	Перекисный гемолиз, %	Осмотический гемолиз, %
Контроль (гемолиз)	–	100	100
Опыт 1 (гемолиз + <i>L. carinthiacum</i>)	0,04	91,03 ± 4,27	59,14 ± 2,15
	0,40	61,18 ± 2,51	50,25 ± 2,02
	4,00	49,92 ± 1,17	26,61 ± 1,14
Опыт 2 (гемолиз + <i>H. erectum</i>)	0,04	72,17 ± 0,14	50,34 ± 1,15
	0,40	31,70 ± 0,15	38,35 ± 0,89
	4,00	27,36 ± 0,28	17,16 ± 0,14

происходит 50 % ингибирование NO, составила > 5000 мкг/мл.

In vitro на моделях перекисного и осмотического гемолиза изучали мембраностабилизирующую активность сухих экстрактов *L. carinthiacum* и *H. erectum* в широком диапазоне концентраций.

Как следует из данных, приведенных в таблице 2, внесение испытуемых экстрактов в инкубационную среду сопровождается снижением выраженности перекисного и осмотического гемолиза эритроцитов.

Установлено, что сухой экстракт *L. carinthiacum* оказывает умеренное мембраностабилизирующее действие. Так, в концентрации 4,0 мг/мл степень перекисного и осмотического гемолиза снижается на 50,08 и 73,39 % соответственно. Сухой экстракт *H. erectum* обладает более выраженной мембраностабилизирующей активностью, и в концентрации 4,0 мг/мл степень перекисного и осмотического гемолиза снижается на 72,64 и 82,84 %, соответственно, по сравнению с контролем. Выраженное мембраностабилизирующее действие экстракта сухого *H. erectum* обусловлено, по-видимому, наличием в основном флавоноидов (производных рутина, изорамнетины) и других представителей классов фенольных соединений [9].

Учитывая, что свободные радикалы, образующиеся в реакции Фентона, индуцируют перекисное окисление липидов клеточных мембран и как следствие этого приводят к гемолизу эритроцитов, можно полагать, что в основе механизма мембраностабилизирующего действия исследуемых фитосредств лежит ингибирование процессов свободнорадикального окисления биологических мембран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об умеренной антиоксидантной, антирадикальной и мембраностабилизирующей активности экстракта сухого *L. carinthiacum* в модельных системах *in vitro*. Экстракт сухой *H. erectum* проявляет более выраженную антиоксидантную, антирадикальную и мембраностабилизирующую активность. Кроме того, исследуемый экстракт *H. erectum* эффективно защищает биологический субстрат от перекисного окисления липидов в

условиях *in vitro*. Данный эффект обусловлен, по-видимому, наличием в его составе флавоноидов (производных рутина, изорамнетины), алкалоидов и других представителей фенольных соединений и полисахаридов.

Результаты проведенных исследований дают основание рассматривать исследуемые экстракты в качестве потенциальных антиоксидантных средств и аргументируют возможности их применения в комплексной терапии заболеваний печени и желчевыводящих путей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Асеева Т.А., Базарон Э.Г., Рязанова О.И. Расшифровка тибетского названия растения «Барба-да» и его применение в индо-тибетской медицине // Растительные ресурсы. — 1979. — Т. 15, Вып. 2. — С. 293–296.
2. Дёрффель К. Статистика в аналитической химии. — М.: Мир, 1994. — 265 с.
3. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лабораторное дело. — 1988. — № 5. — С. 59–62.
4. Ковалев И.Е. и др. Влияние энзимеланина на гемолиз эритроцитов, вызываемый свободнорадикальными реакциями и другими факторами // Фармакол. и токсикол. — 1986. — № 4. — С. 89–91.
5. Мягмар Л. Исследование желчегонного действия ломатогониума каринтийского (*Lomatogonium carinthiacum* (Wulf.) Reichenb.) произрастающего в МНР: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Рязань, 1974. — 24 с.
6. Николаев С.М. Растительные лекарственные препараты при повреждении гепатобилиарной системы. — Новосибирск, 1992. — 155 с.
7. Оленников Д.Н. и др. Химический состав сока каллизии душистой (*Callisia fragrans* Wood.) и его антиоксидантная активность (*in vitro*) // Химия растит. сырья. — 2008. — № 4. — С. 95–100.
8. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства *Caprifoliaceae* — *Plantaginaceae*. — Л., 1990. — 328 с.
9. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование;

Семейства *Magnoliaceae* – *Limoniaceae*. – Л., 1985. – 315 с.

10. Самбуева З.Г., Бальжиров Б.Г., Федоров А.В. Желчегонное действие экстракта ломатогониума каринтийского // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2011. – Т. 77, № 1. – С. 174 – 176.

11. Федоров А.В., Самбуева З.Г., Лубсандоржиева П.Б. Влияние экстрактов *Lomatogonium carinthiacum* (Wulf.) Reichenb. и *Hypocoum erectum* L. на холерез у белых крыс при экспериментальном гепатите // Актуальные проблемы управления здоровьем населения : сб. науч. тр. – Н. Новгород, 2012. – Вып. V. – С. 137 – 141.

12. Chen A.-S., Taguchi T., Sakai K., Kikuchi K. Antioxidant activities of chitibiose and chititriose // Biol. Pharm. Bull. – 2003. – Vol. 26, N 9 – P. 1326 – 1330.

13. Govindarajan R., Rastogi S., Vijayakumar M. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gagenticum* // Biol. Pharm. Bull. – 2003. – Vol. 26, N 10. – P. 1424 – 1427.

14. Rosidah Yam M., Sadikun A., Asmawi M. Antioxidant potential of *Gynura procumbens* // Pharm. Biol. – 2008. – Vol. 46. – P. 616 – 625.

15. Schlesier K. et al. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods // Free Radic. Res. – 2002. – Vol. 36. – P. 177 – 187.

16. Seyoum A., Asres K., El-Fiky F.K. Structure-radical scavenging relationships of flavonoids // Phytochemistry. – 2006. – Vol. 67, N 18. – P. 2058 – 2070.

17. Sorig T. Isolierung von Flavonverbindungen aus *Lomatogonium carinthiacum* (Wulf.) Reichenb // Farmazie. – 1978. – Vol. 33, N 1. – P. 84.

Сведения об авторах

Торопова Анюта Алексеевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории безопасности биологически активных веществ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН (670042, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: (3012) 43-37-13; e-mail: anyuta-tor@mail.ru)

Разуваева Янина Геннадьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории безопасности биологически активных веществ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: (3012) 43-37-13; e-mail: tatur75@mail.ru)

Николаев Сергей Матвеевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий Отделом биологически активных веществ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: (3012) 43-37-13)

Федоров Андрей Витальевич – аспирант кафедры фармакологии, клинической фармакологии и фитотерапии медицинского факультета ФГБОУ ВПО «Бурятский государственный университет» (670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а)

Самбуева Зинаида Гомбожаповна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории безопасности биологически активных веществ ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН (670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6; тел.: (3012) 43-37-13)