

Экспериментальная оценка действия фитоэкдистероидов на процессы перекисного окисления липидов печени крыс при проведении опытов *in vitro* и *in vivo*

© 2012. З. А. Хушбактова, д.б.н., в.н.с., А. В. Царук, аспирант, В. М. Гукасов, д.м.н., зав. лабораторией, В. Н. Сыров, д.м.н., зав. лабораторией, Институт химии растительных веществ им. акад. С. Ю. Юнусова Академии наук Республики Узбекистан, e-mail: kh.zainb@gmail.com

Экдистерон и туркестерон оказывают ингибирующее влияние на процессы перекисного окисления липидов как в опытах *in vitro* (наблюдается задержка развития железоиндуцируемой хемилюминесценции в гомогенатах печени крыс), так и в опытах *in vivo* (после введения в организм животных отмечено достоверное уменьшение содержания в печени малонового диальдегида). Циастерон, отличающийся от экдистерона и туркестерона наличием в структуре лактонового кольца, в первом случае оказывает прооксидантное действие, во втором проявляет схожий с ними эффект. Все три исследованных фитоэкдистероида при введении крысам повышают активность ферментов антиоксидантной защиты организма – каталазы и супероксиддисмутазы.

Ecdysterone and turkesterone exert an inhibiting influence on processes of lipids peroxidation in experiments *in vitro* (retardation of the development of ferrum-induced chemoluminescence in homogenates of rats liver) as well as *in vivo* (significant decrease of malonic dialdehyde content in liver after administration of the preparations to animals). Cyasterone differed from ecdysterone and turkesterone by the presence of lactonic ring in the structure, in experiments *in vitro* exerts prooxidant action, but *in vivo* it manifests antioxidant effect typical for two first ecdysteroids. All three ecdysteroids under investigation increase activity of the enzymes of antioxidant protection of an organism: catalase and superoxide dismutase.

Ключевые слова: экдистерон, туркестерон, циастерон, перекисное окисление липидов, антиоксидантный эффект, высшие животные
Keywords: ecdysterone, turkesterone, cyasterone, lipid peroxidation, antioxidant effect, higher animals

Работы Nakanishi et al. [1], а также Galbraith и Horn [2] положили начало выделению из растений стероидных веществ с активностью гормонов линьки и метаморфоза насекомых, названных впоследствии фитоэкдистероидами [3]. Фармакологические исследования фитоэкдистероидов выявили у них способность активно влиять на метаболические (прежде всего белково-анаболические) процессы в организме млекопитающих [4 – 6]. Известно, что биологический эффект стероидов, в том числе и различных стероидных гормонов высших животных, во многом обусловлен первоначальным изменением физико-химических свойств мембран клеток и субклеточных структур [7] за счёт воздействия на происходящие в их липидном компоненте процессы перекисного окисления липидов [8]. Отсутствие чётких и однозначных данных в этом аспекте касательно фитоэкдистероидов послужили основанием для проведения данной работы.

Материалы и методы

В работе исследовали экдистерон, туркестерон и циастерон (рис.), выделенные из *Rhaponticum carthamoides* и *Ajuga turkestanica* [9, 10]. В опытах *in vitro* их влияние на перекисное окисление липидов (ПОЛ) изучали в гомогенатах печени крыс-самцов (массой 150-180 г), оценивая изменения параметров хемилюминесценции (ХЛ), сопровождающей этот процесс в присутствии Fe²⁺ [11].

Во всех случаях эксперимента регистрировали интенсивность «быстрой» вспышки ХЛ, латентный период, скорость нарастания, а также светосумму «медленной» вспышки ХЛ. Измерение сверхслабого свечения производили на установке, включающей в себя чувствительный детектор сверхслабой ХЛ – фотоэлектронный умножитель ФЭУ-39А, источником стабилизированного напряжения для которого служил высоковольтный стабилизатор ВС-22.

Электросигнал с ФЭУ усиливался с помощью усилителя ЛПУ-01 и регистрировался на самопишущем потенциометре КСП-4. Гомогенат печени помещался в термостатируемую (37 °С) кювету в темновой камере. Объём каждой пробы доводили до 9 мл среды инкубации, содержащей 105 мМ КСl, 20 мМ КН₂РО₄ (рН 7,4). Концентрация белка в 1 мл составляла 1,8 мг (определяли по Лоури). Спустя 4 мин после введения различных концентраций стероидов в кювету добавляли ионы двухвалентного железа из расчета 1,0 мл 1·10⁻² М раствора FeSO₄, после чего начинали регистрацию ХЛ.

В серии экспериментов *in vivo* фитоэкдистероиды вводили непосредственно в организм животных (по шесть в группе) по 5 мг/кг орально в течение семи дней. О выраженности процессов перекисного окисления липидов в их организме в данном случае судили по содержанию в печени одного из конечных продуктов ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) [12]. Кроме того, в печени определяли активность ферментов системы антиоксидантной защиты организма – каталазы и супероксиддисмутазы (СОД) [13, 14].

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Проведённая работа показала, что изучаемые фитоэкдистероиды, заметно отличающиеся между собой по химическому строению, оказывают неоднозначное влияние на перекисное окисление липидов в системе *in vitro* с использованием гомогенатов печени крыс. Так, только экдистерон (табл. 1) проявил чёткое, хотя и достаточно слабое ингибирующее влияние на этот процесс, которое проявлялось задержкой в развитии ХЛ (происходило уменьшение «быстрой» и «медленной» вспышек ХЛ, а также «стационарного свечения»).

Действие же туркестерона проявлялось ингибирующим влиянием на ХЛ только по таким определяемым параметрам, как латентный период, скорость нарастания и светосумма «медленной» вспышки. В то же время чётко прослеживалось дозозависимое увеличение интенсивности «быстрой» вспышки ХЛ. Однако, несмотря на эти различия, пользуясь формулой [8] (для чего графически определяли концентрацию соединения, уменьшающую угол наклона полулогарифмических апоморфоз «медленной» вспышки ХЛ в два раза), для экдистерона и туркестерона была рассчитана величина антиокислительной активности (АОА), которая составила в данном случае 3,3·10² и 2,8·10² М⁻¹ соответственно. Эти значения оказались несравненно меньше значений АОА, полученной в соответствующих экспериментах для собственных гормонов млекопитающих, в частности, таких как эстрон, относящийся к классическим антиоксидантам [15]. Что же касается циастерона, то он не только не вызывал торможения ПОЛ в модельной системе, а напротив, проявлял выраженный прооксидантный эффект. Под его влиянием более, чем в 10 раз, увеличивалась интенсивность «быстрой» вспышки и существенно повышалась скорость нарастания и светосумма «медленной» вспышки ХЛ.

Таким образом, полученные на основе хемилюминесцентного анализа данные показали наличие непосредственной антиоксидантной активности у экдистерона и туркестерона. Обнаруженный же прооксидантный эффект циастерона, проявляющегося в организме вышших животных схожую с другими фитоэкдистероидами активность [5, 8], позволял предполагать наличие у него опосредованного механизма ингибирующего ПОЛ действия за счет стимуляции эндогенной антиоксидантной системы организма.

В отдельно проведённой серии экспериментов в условиях, когда исследуемые фито-

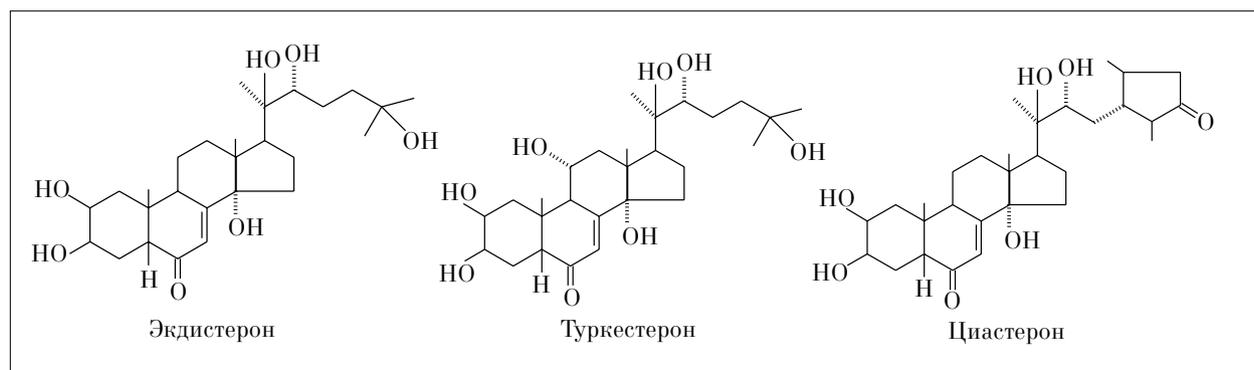


Рисунок. Строение экдистерона, туркестерона и циастерона

Таблица 1

Влияние фитоэкдистероидов на параметры кинетики железоиндуцируемой хемилюминесценции гомогенатов печени крыс в опытах *in vitro*, $M \pm m$

Исследуемое соединение	Концентрация, М	Параметр				АОА, M^{-1}
		I	II	III	IV	
Экдистерон	0	$5,0 \pm 0,40$	$2,4 \pm 0,26$	$143 \pm 12,8$	$1,73 \pm 0,072$	$3,3 \cdot 10^2$
	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \pm 0,33$	$2,8 \pm 0,30$	$133 \pm 13,1$	$1,23 \pm 0,068^*$	
	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \pm 0,36$	$3,1 \pm 0,24$	$122 \pm 14,1$	$0,81 \pm 0,032^*$	
	$7,8 \cdot 10^{-3}$	$3,0 \pm 0,48^*$	$7,4 \pm 0,49^*$	$73,5 \pm 7,8^*$	$0,36 \pm 0,011^*$	
Туркестерон	0	$5,0 \pm 0,36$	$2,3 \pm 0,24$	$160 \pm 15,4$	$1,80 \pm 0,033$	$2,8 \cdot 10^2$
	$3,0 \cdot 10^{-3}$	$6,0 \pm 0,38$	$2,6 \pm 0,21$	$142 \pm 12,1$	$1,54 \pm 0,021^*$	
	$6,0 \cdot 10^{-3}$	$9,0 \pm 0,42^*$	$2,9 \pm 0,18$	$132 \pm 14,2$	$1,23 \pm 0,018^*$	
	$9,0 \cdot 10^{-3}$	$9,0 \pm 0,44^*$	$10,9 \pm 0,52^*$	$112 \pm 9,7^*$	$0,38 \pm 0,012^*$	
Циастерон	0	$5,0 \pm 0,46$	$2,3 \pm 0,28$	$140 \pm 11,2$	$1,49 \pm 0,031$	-
	$5,0 \cdot 10^{-3}$	$64,0 \pm 1,7^*$	$3,0 \pm 0,27$	$237 \pm 14,3^*$	$2,05 \pm 0,098^*$	
	$1,0 \cdot 10^{-2}$	$72,0 \pm 3,3^*$	$2,9 \pm 0,19$	$235 \pm 18,4^*$	$2,25 \pm 0,044^*$	
	$5,0 \cdot 10^{-2}$	$52,0 \pm 1,8^*$	$3,0 \pm 0,18$	$224 \pm 10,2^*$	$1,73 \pm 0,019^*$	

Примечание: I – интенсивность «быстрой» вспышки, *отн. ед.*, II – латентный период, *мин.*; III – светосумма «медленной» вспышки, *отн. ед.*; IV – скорость нарастания, которую определяли как тангенс угла наклона прямой, выражающей зависимость логарифма интенсивности свечения от времени на начальной экспоненциальной стадии «медленной» вспышки; АОА – актиокислительная активность. Цифровые значения определяемых параметров являются средними величинами из пяти наблюдений. Различия (*) с соответствующим контролем достоверны при $p < 0,05$. Почерк – эффект отсутствовал.

Таблица 2

Влияние фитоэкдистероидов на содержание в печени крыс малонового диальдегида (МДА), каталазы и супероксиддисмутазы (СОД), $M \pm m$

Условия опыта	МДА, нмоль/мг белка	Каталаза, моль/мин/г белка	СОД, усл. ед./мин/мг белка
Интактные животные (контроль)	$0,731 \pm 0,04 (-)$	$15,8 \pm 0,78 (-)$	$1,58 \pm 0,08 (-)$
Экдистерон	$0,563 \pm 0,02^* (-29,8)$	$18,8 \pm 0,82^* (+18,9)$	$1,96 \pm 0,12^* (+24,0)$
Туркестерон	$0,572 \pm 0,02^* (-27,8)$	$19,0 \pm 0,92^* (+20,2)$	$1,98 \pm 0,14^* (+25,3)$
Циастерон	$0,584 \pm 0,03^* (-25,2)$	$18,4 \pm 0,84^* (+16,5)$	$1,88 \pm 0,10^* (+18,9)$

Примечание: в скобках указан эффект, %. Различия (*) между значениями указанных величин достоверны при $p < 0,05$.

экдистероиды вводились непосредственно в организм животных, эта гипотеза нашла своё чёткое подтверждение. Показано, что все три тестируемых стероида достаточно выражено и примерно в равной степени уменьшали в печени млекопитающих содержание МДА (табл. 2). При этом наблюдали достоверное повышение активности каталазы (16–20%) и СОД (на 19–24%). Все эти данные совместно с имеющимися фактами об установлении под действием фитоэкдистероидов прочного сопряжения между белками и фосфолипидами мембран (выявлено на митохондриях печени крыс с хроническим токсическим гепатитом [16]) свидетельствуют о том, что они не являются истинными ингибиторами свободнорадикального окисления как, например, фенольные соединения [17] (хотя эффект экдистерона и несколько напоминает их действие).

Фитоэкдистероиды, скорее всего, следует рассматривать в качестве структурных антиоксидантов, чьё антиокислительное действие опосредуется изменением мембранных структур.

Полученные данные во многом дополняют спектр известных биологических эффектов фитоэкдистероидов в организме высших животных и дают возможность лучше понять их позитивных эффект, обнаруживаемый при введении экспериментальным животным с рядом патологических состояний, в развитии которых не последнюю роль играет резкая активация процессов перекисного окисления липидов (гепатит, миокардит) [18, 19].

Литература

1. Nakanishi K., Koreeda M., Sasaki S. et al. Insect hormones. I. The structure of ponasteron A an insect-

moulting hormone from the leaves of *Podocarpus nakaii* Hay // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1966. V. 24. P. 915–917.

2. Galbraith M.N., Horn D.H.S. An Insect-moulting hormone from a plant // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1966. V. 24. P. 905–906.

3. Goodwin T.W., Horn D.H.S., Karlson P. et al. Ecdysteroids: a generic term // *Nature.* 1978. V. 272. № 5649. P. 122.

4. Ахрем А.А., Ковганко Н.В. Экдистероиды: химия и биологическая активность. Минск: Наука и техника, 1989. 327 с.

5. Сыров В.Н., Саатов Э., Сагдуллаев Ш.Ш., Маматханов А.У. Зависимость структура-анаболическое действие фитоэкдистероидов, выделенных из растений Центрально-азиатского региона // *Хим.-фарм. журн.* 2001. № 12. С. 23–27.

6. Фитоэкдистероиды / Под ред. В.В. Володина. СПб.: Наука, 2003. 293 с.

7. Сергеев П.В., Сейфулла Р.Д., Майский А.И. Молекулярные аспекты действия стероидных гормонов. М.: Наука, 1971. 224 с.

8. Владимиров Ю.А., Сергеев П.В., Сейфулла Р.Д., Руднев Ю.Н. Влияние стероидов на перекисное окисление липидов мембран митохондрий печени // *Мол. биол.* 1973. Т. 7. № 2. С. 247–253.

9. Балтаев У.А., Абубакиров Н.К. Фитоэкдистероиды *Rhaponticum carthamoides* // *Химия природных соединений.* 1987. № 5. С. 681–684.

10. Усманов Б.З., Горовиц М.Б., Абубакиров Н.К. Фитоэкдизоны *Ajuga turkestanica*. III. Строение туркестерона // *Химия природных соединений.* 1975. № 4. С. 466–470.

11. Владимиров Ю.А., Сусллова Т.Б., Оленев В.И. Хемилюминесценция, сопряженная с образованием ли-

пидных перекисей в биологических мембранах // *Биофизика.* 1969. Т. 14. № 5. С. 836–845.

12. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // *Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 66–68.*

13. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Т. и др. Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело.* 1988. № 1. С. 16–19.

14. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // *Лабораторное дело.* 1983. № 10. С. 30–33.

15. Гукасов В.М., Федоров В.К. Влияние гормонов на процесс перекисного окисления липидов биологических мембран // *Роль изменений структуры мембран в клеточной патологии. М. 1977. С. 8–52.*

16. Ташмухамедова М.А., Алматов К.Т., Хушбактова З.А. и др. Влияние фитоэкдистероидов и стеранаболов на активность и стабильность мембранно-связанных ферментов митохондрий печени при экспериментальном гепатите // *Вопр. мед. химии.* 1986. № 1. С. 81–84.

17. Барабой В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений. Киев: Наукова думка, 1976. 260 с.

18. Сыров В.Н., Хушбактова З.А., Набиев А.Н. Экспериментальное изучение гепатопротекторных свойств фитоэкдистероидов и неробола при поражении печени четыреххлористым углеродом // *Эксперим. клин. фармакол.* 1992. № 3. С. 61–65.

19. Сыров В.Н., Хушбактова З.А., Ташмухамедова М.А. и др. Выделение экдистерона и силенеозид А из силены брагуйской и изучение их фармакологического действия при экспериментальной миокардиодистрофии // *Кимё ва фармация (Ташкент).* 1997. № 4. С. 43–47.

Производные экдистероидов как новые модуляторы устойчивости раковых клеток, обладающих множественной лекарственной резистентностью

© 2012. А. Мартинс¹, Н. Тот¹, Дж. Молнар², М. Батори¹, А. Хуняди¹,

¹ Институт фармакогнозии, факультет фармации, Университет Сегеда, Венгрия

² Кафедра медицинской микробиологии и иммунологии, факультет медицины, Университет Сегеда, Венгрия

e-mail: hunyadi.a@pharm.u-szeged.hu

Phytoecdysteroids, analogues of the moulting hormone of arthropods, have been described for their multiple beneficial effects accompanied

by a very low toxicity in mammals [1]. Ecdysteroids seem to possess general health-improving action for mammals and humans [1 – 3], that is