

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ДИГИДРОКВЕРЦЕТИНА ИНГИБИРОВАТЬ ОКИСЛЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА ОЗОНОМ

В. С. Роговский¹, М. А. Розенфельд², С. Д. Разумовский²,
А. И. Матюшин¹, Н. Л. Шимановский¹, В. Б. Леонова², М. Л. Константинова²

В работе оценивали способность дигидрокверцетина ингибировать окисление фибриногена. Дигидрокверцетин ингибирует окисление фибриногена озоном, предотвращая окислительное повреждение фибриногена и сохраняя его функциональную активность.

Ключевые слова: дигидрокверцетин; таксифолин; окислительное повреждение фибриногена; окисление озоном

ВВЕДЕНИЕ

Дигидрокверцетин (ДГК, таксифолин) — природный флавоноид, обладающий выраженной антиоксидантной активностью. Флавоноиды, или биофлавоноиды, являются одним из классов растительных полифенолов, обладающих широким спектром биологического действия и придающих окраску растениям. Соединения, обладающие антиоксидантной активностью, находят все более широкое применение в терапии заболеваний, при которых индукция перекисного окисления липидов является одним из основных элементов патогенеза. К таким заболеваниям относятся нарушения мозгового кровообращения, ишемическая болезнь сердца, васкулиты различной этиологии и многие другие [5]. В последнее время, помимо защитного действия антиоксидантов в отношении повреждения липидов клеточных мембран, все большее внимание уделяется возможностям антиоксидантов, в том числе дигидрокверцетина, предотвращать окисление белков. В настоящее время общепризнано, что многие аминокислотные остатки белков являются чувствительными к окислению различными формами активного кислорода (ROS). Свободнорадикальное окисление белков может сопровождаться расщеплением полипептидных цепей, модификацией аминокислотных остатков и превращением белков в соединения, высокочувствительные к протеолитической деградации [4]. Белки, подвергнутые окислительной модификации, накапливаются в организме с возрастом, при окислительном стрессе и целом ряде заболеваний, в частности, при сахарном диабете [3, 12, 14]. Известно, что одним из важнейших белков плазмы крови является фибриноген, играющий ключевую роль в свертывающей системе крови. Отмечено, что при многих заболеваниях происходит усиленное окисление фибриноге-

на, существенно уменьшающее его функциональную активность. Поэтому изучение способности различных соединений предотвращать окислительное повреждение белков плазмы крови, в частности, фибриногена, представляется актуальным. В связи с вышесказанным целью данной работы явилось исследование способности дигидрокверцетина ингибировать окисление фибриногена.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Окисление раствора фибриногена проводили в стандартных условиях, а также в присутствии дигидрокверцетина. В исследовании использовали бычий фибриноген, полученный из цитратной плазмы крови и дополнительно очищенный от примесей пламиногена и фибринстабилизирующего фактора, как описано ранее [6]. Полученный фибриноген переводили методом гель-фильтрации с использованием сефадекса G-25 в 0,06 М фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий 0,15 М NaCl.

Для оценки влияния дигидрокверцетина на окисление фибриногена проводили сравнение УФ-спектров исследуемых растворов до и после окисления. Сохранность функциональной активности фибриногена оценивали по его способности образовывать фибриновый сгусток после добавления тромбина.

При исследовании влияния дигидрокверцетина на окисление фибриногена в качестве окислителя использовался озон, который был выбран исходя из следующих соображений. Этот природный реагент, относящийся к представителям активных форм кислорода, является чрезвычайно удобным для проведения исследований в модельных системах. Время его полужизни в водных растворах при наличии субстрата окисления не превышает 1–2 мин. Степень окисления объекта строго регулируется, поскольку количество озона, реагирующего с восстановителем, точно оценивается спектрофотометрически при длине волны 254 нм. Озонирование растворов фибриногена проводилось в реакторе объемом $3,3 \cdot 10^{-3}$ л, снабженном кварцевыми окнами, продуванием озono-кислородной смеси через свободный объем реактора. Количество озона в ре-

¹ Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии им. академика РАМН П. В. Сергеева медико-биологического факультета (зав. — чл.-корр. РАМН Н. Л. Шимановский) ГБОУ ВПО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Минздрава России, 119021, Москва, ул. Большая Пироговская, 9а.

² Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.

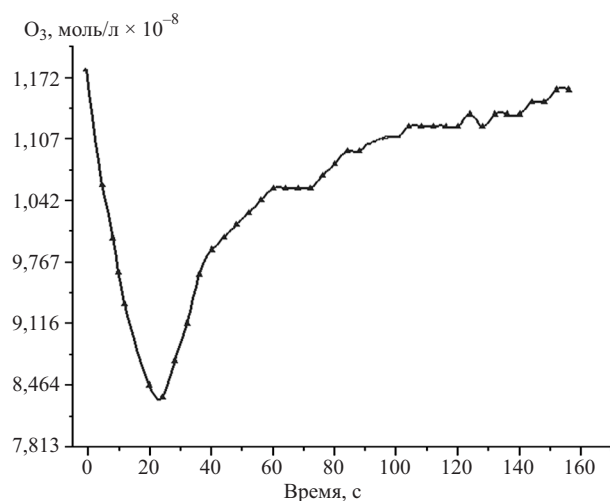


Рис. 1. Кинетика поглощения озона дигидрохверцетином (объяснение в тексте).

акторе составляло $2 \cdot 10^{-7}$ М. Озон синтезировали в разрядном устройстве, при пропускании струи кислорода между электродами. Спектры в ультрафиолетовой области белков до и после озонирования записывали на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) в 1 см кварцевых ячейках.

Изучение кинетики поглощения дигидрохверцетином (FLUKA, чистота $\geq 85\%$ (ВЭЖХ) озона проводили барботажным методом, при котором через слой раствора, содержащего исследуемое соединение, пропускают озон, фиксируя изменение концентрации озона после прохождения через раствор. Оценка функциональной активности фибриногена, как до, так и после окисления озонем, проводилась с помощью определения времени образования фибринового сгустка после добавления тромбина (“Roche”, Франция) в раствор фибриногена. Раствор 0,05 мл тромбина объемом (2,5 ед. НИИ) добавляли к 0,3 мл исследуемой пробы. Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6. Для оценки значимости выявленных различий использовали критерий Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе, используя барботажный метод окисления озонем, нами изучена кинетика взаимодействия озона с дигидрохверцетином. Концентрация дигидрохверцетина составляла 10^{-5} М. Кинетика погло-

щения озона дигидрохверцетином представлена на рис. 1. Как видно на графике, на начальном этапе происходит снижение концентрации озона на выходе из реактора, связанное с поглощением озона дигидрохверцетином. Далее следует восходящий участок кривой, отражающий увеличение концентрации озона на выходе из реактора, связанное с тем, что весь дигидрохверцетин, находящийся в реакторе, прореагировал с озонем.

По данным, представленным на рис. 1, с использованием формулы 1 [6, 7], были рассчитаны константа скорости взаимодействия озона с дигидрохверцетином и стехиометрический коэффициент реакции, который определяется отношением количества поглощенного озона к количеству прореагировавшего вещества. Стехиометрический коэффициент реакции взаимодействия озона с дигидрохверцетином составил 3. Константа скорости взаимодействия озона с ДГК составляет $1 \cdot 10^3$, данная реакция носит необратимый характер.

Формула 1. Формула для определения константы скорости взаимодействия дигидрохверцетина с озонем.

$$k = W([O_3]_0 - [O_3]_{\text{газ}}) / \alpha [O_3]_{\text{газ}} [\text{реагент}],$$

где W — скорость подачи газовой смеси (50–200 л/мин); α — растворимость озона в воде, определяется экспериментальным путем и составляет 0,32; $[O_3]_0$ — начальная концентрация озона; $[O_3]_{\text{газ}}$ — концентрация озона на выходе из реактора; [реагент] — исходная концентрация реагентов.

Для изучения совместного окисления озонем фибриногена и дигидрохверцетина предварительно исследовали взаимодействие нативного фибриногена с озонем. Для этого была проведена реакция окисления фибриногена в закрытом реакторе на протяжении 10 мин. Интенсивность и характер процесса окисления определяли по УФ-спектрам, полученным для неокисленного и окисленного фибриногена. На рис. 2 представлены спектры нативного и окисленного фибриногена. Реакцию окисления фибриногена озонем оценивали по изменению оптической плотности при длине волны 280 нм, характерной для аминокислотных остатков, содержащих фенольные группы, такие как тирозин, фенилаланин, а также остатков, имеющих ненасыщенные циклы триптофана и гистидина.

Спектр окисленного фибриногена свидетельствует о том, что при окислении озонем данного белка проис-

Таблица 1. Оптическая плотность в максимумах поглощения изучаемых соединений ($M \pm s.e.m.$)

Вещество	Оптическая плотность (D)	Длина волны, нм	Оптическая плотность, %
Фибриноген до озонирования	$0,40 \pm 0,02$	278	100
Фибриноген после озонирования	$0,29 \pm 0,03^*$	265	73*
Фибриноген + ДГК до озонирования	$0,48 \pm 0,02$	279	100
Фибриноген + ДГК после озонирования	$0,42 \pm 0,03^*$	271	88*

Примечание. * — отличия от контроля достоверны ($p < 0,05$).

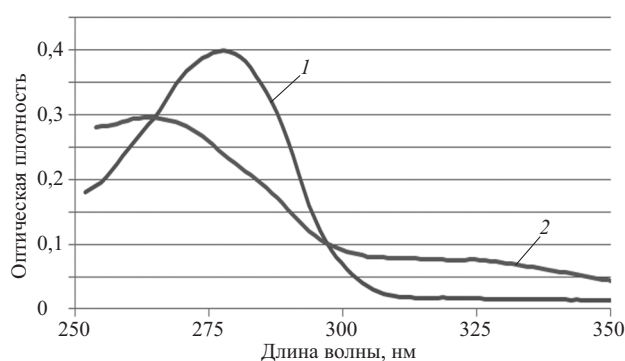


Рис. 2. УФ-спектры фибриногена (1,87 мг/мл) до (1) и после (2) окисления озонем.

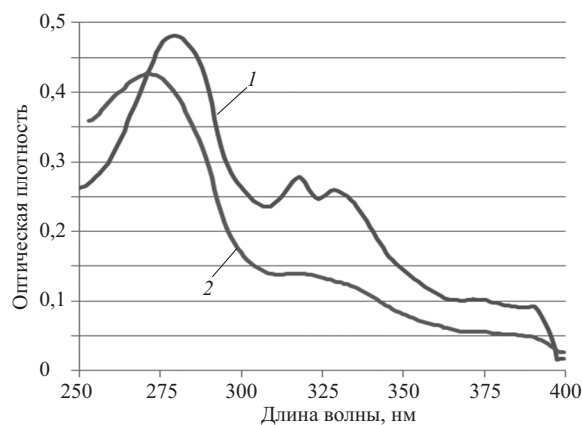


Рис. 3. УФ-спектры фибриногена (1,87 мг/мл) в присутствии дигидрокверцетина ($0,8 \cdot 10^{-4}$ М) до (1) и после (2) окисления озонем.

ходит уменьшение амплитуды максимума поглощения фибриногена, а также смещение этого максимума в коротковолновую область. Отмечается также появление нового минорного максимума поглощения при длине волны 325 нм, что может быть обусловлено образованием хиноидных структур из феноксильных и имидазольных ядер аминокислотных остатков под действием озона.

Далее был изучен процесс окисления озонем фибриногена в присутствии дигидрокверцетина (рис. 3).

Сопоставляя спектры, представленные на рис. 2 и рис. 3, видно, что в случае окисления фибриногена в присутствии дигидрокверцетина оптическая плотность в максимуме поглощения фибриногена уменьшается на 12 %, тогда как в отсутствие дигидрокверцетина происходит более значимое уменьшение оптической плотности фибриногена — на 27 %. Таким образом, дигидрокверцетин оказывает защитное влияние на окисление фибриногена озонем, вступая в реакцию с озонем и, следовательно, препятствуя окислительной деструкции фибриногена. Для удобства сравнения составлена табл. 1, включающая оптическую плотность в максимумах поглощения нативного фибриногена, окисленного фибриногена, а также смеси фибриногена с дигидрокверцетином и окисленной смеси фибриногена с дигидрокверцетином.

Для определения функциональной активности фибриногена после его окисления озонем в отсутствие и в присутствии ДГК была оценена способность фибриногена формировать фибриновый сгусток после добавления тромбина. Результаты данного исследования представлены в табл. 2.

Из приведенной таблицы видно, что фибриноген, окисленный в отсутствие дигидрокверцетина, полностью утратил свою функциональную активность, тогда как фибриноген, окисленный в присутствии дигидрокверцетина, в значительной степени сохранил свои свойства. Данный эффект дигидрокверцетина повышался с увеличением его концентрации. Выявленная способность дигидрокверцетина защищать фибриноген от окисления может иметь клиническое значение, так как фибриноген, по крайней мере, в 20 раз более чув-

ствителен к окислительной модификации по сравнению с другими основными плазменными белками: альбумином, иммуноглобулинами, трансферрином, церулоплазмином [6, 11]. Это позволяет фибриногену легко вступать в реакцию свободнорадикального окисления, что вызывает образование окисленных форм белка, отличающихся от нативной формы как по химическому составу, так и по структурной организации. Вследствие этого изменяются функциональные свойства фибриногена. За счет формирования нековалентных связей он приобретает способность к образованию макромолекулярных кластеров [11]. Окисленный фибриноген теряет катализируемую тромбином способность формировать фибриновый сгусток [13], угнетает адгезию и агрегацию тромбоцитов [10], усиливает активность тканевого активатора плазминогена, негативно влияет на гемореологические параметры [8], активно вовлекается в процесс воспаления сосудистой стенки и способен в большей степени, по сравнению с нативным фибриногеном, индуцировать в первичной культуре эндотелия кровеносных сосудов человека продукцию интерлейкина-8, вызывающего хемотаксис клеток иммунной системы [1, 7, 9]. Окисление фибриногена вызывает дисбаланс в свертывающей системе крови, с одной стороны, увеличивая время фибринообразования и угнетая адгезию и агрегацию тромбоцитов, а с другой — потенцируя формирование устойчивых агрегатов из активированных тромбоцитов с нейтрофилами [2]. В связи с этим в дальнейшем целесообразно в клинических условиях оценить способ-

Таблица 2. Время образования фибринового сгустка (t) у нативного фибриногена, окисленного фибриногена, а также у окисленной смеси фибриногена с дигидрокверцетином ($M \pm s.e.m.$)

t , Фибриноген неокисленный, с	t , Фибриноген + ДГК ($2,5 \cdot 10^{-4}$ М) окисленный, с	t , Фибриноген + ДГК ($0,8 \cdot 10^{-4}$ М) окисленный, с	t , Фибриноген окисленный
59 ± 1	64 ± 1	86 ± 2	—

ность дигидрокверцетина уменьшать уровень окисленного фибриногена у больных в условиях окислительного стресса.

ВЫВОДЫ

1. Дигидрокверцетин уменьшает окисление озоном фибриногена (оптическая плотность фибриногена в его максимуме поглощения уменьшилась на 12 % после озонирования в присутствии дигидрокверцетина, тогда как в отсутствие дигидрокверцетина оптическая плотность фибриногена в его максимуме поглощения после озонирования уменьшилась на 27 %).

2. В присутствии дигидрокверцетина фибриноген сохраняет способность полимеризовываться в фибрин после окисления озоном, тогда как при окислении фибриногена, не защищенного дигидрокверцетином, функциональная активность фибриногена полностью утрачивается.

ЛИТЕРАТУРА

1. О. А. Азизова, Е. В. Максянина, Ю. А. Романов, и др., *Бюл. exper. биол.*, № 137, 406 – 409 (2004).
2. О. А. Азизова, А. В. Асейчев, А. П. Пирязев, Л. В. Шуленина, *Бюл. exper. биол.*, № 3, 284 – 290 (2009).

3. И. П. Иванова, Д. И. Князев, Ю. В. Кудрявцев, *Современные технологии в медицине*, № 3, 16 – 20 (2011).
4. В. И. Лушак, *Биохимия*, **72**, 995 – 1017 (2007).
5. Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др., *Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты*, Фирма “Слово”, Москва (2006).
6. М. А. Розенфельд, В. Б. Леонова, М. Л. Константинова, С. Д. Разумовский, *Известия РАН, сер. биол.*, № 6, 671 – 679 (2008).
7. М. А. Розенфельд, В. Б. Леонова, А. Н. Щеголихин, и др., *Биохимия*, **75**(10), 1451 – 1461 (2010).
8. Е. В. Ройтман, О. А. Азизова, Ю. А. Морозов, А. В. Асейчев, *Бюл. exper. биол.*, № 138, 527 – 530 (2004).
9. О. Н. Щегловитова, О. А. Азизова, Ю. А. Романов, и др., *Бюл. exper. биол.*, № 142, 277 – 281 (2006).
10. M. A. Belisario, D. Domenico, C. Pelagalli, et al., *Biochimie*, № 79, 449 – 455 (1997).
11. L. C. Dijkgraaf, G. Zaardeneta, F. W. Corddewener, et al., *J. Oral Maxillofac Surg.*, № 61, 101 – 111 (2003).
12. K. B. Pandey, N. Mishra, S. I. Rizvi, *Clinical Biochemistry*, **43**(4 – 5), 508 – 511 (2010).
13. E. Shacter, J. A. Williams, R. F. Levine, *Free Radic. Biol. Med.*, № 18, 815 – 831 (1995).
14. E. R. Stadtman, *Free Radic. Res.*, № 40, 1250 – 1258 (2006).

Поступила 15.06.12

ESTIMATING ABILITY OF DIHYDROQUERCETIN TO INHIBIT OXIDATION OF FIBRINOGEN BY OZONE

V. S. Rogovskii¹, M. A. Rozenfeld^{2*}, S. D. Razumovskii², A. I. Matyushin¹, N. L. Shimanovskii¹, V. B. Leonova², and M. L. Konstantinova²

¹ Department of Molecular Pharmacology and Radiobiology, Medico-Biological Faculty, Pirogov, Russian State Medical University, ul. Bolshaya Pirogovskaya 9a, Moscow, 119021, Russia

² Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991, Russia

The ability of dihydroquercetin to inhibit the oxidation of fibrinogen has been evaluated. It is established that dihydroquercetin inhibits oxidation of fibrinogen by ozone, thus preventing oxidative modification of fibrinogen and preserving its functional activity.

Keywords: dihydroquercetin; taxifolin; oxidative damage of fibrinogen; oxidation by ozone