

В. В. Барбакадзе¹, Э. П. Кемертелидзе¹, К. Г. Мулкиджанян¹,
А. Дж. Дж. ван ден Берг², К. Дж. Бьюкельман², Э. ван ден Ворм²,
Г. К. Кверлес ван Уффорд², А. И. Усов³

АНТИОКСИДАНТНАЯ И АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИ[3-(3,4-ДИГИДРОКСИФЕНИЛ)ГЛИЦЕРИНОВОЙ КИСЛОТЫ] ИЗ *Symphytum asperum* Lepech. и *S. caucasicum* Bieb. (Boraginaceae)

¹ Институт фармакохимии им. И. Г. Кутателадзе АН Грузии, Тбилиси, Грузия;

² Утрехтский университет, Утрехт, Нидерланды;

³ Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва, Россия

Четыре водорастворимые высокомолекулярные (> 1000 кДа) фракции из корней и стеблей *S. asperum* и *S. caucasicum*, главным компонентом которых является поли[3-(3,4-дигидроксифенил)глицериновая кислота] проявляют антикомплементарную и антиоксидантную активность, выражающуюся в снижении активных форм кислорода (АФК) за счет как прямого вмешательства в процесс их образования полиморфноядерными нейтрофилами, так и непосредственного связывания АФК. Высокая антикомплементарная и антиоксидантная активность названного полимера указывает на возможность его использования в качестве противовоспалительного, вазопротекторного и ранозаживляющего средства.

Природные соединения, влияющие на систему комплемента человека и/или на процесс образования активных форм кислорода (АФК), могут быть использованы для предотвращения тканевых повреждений при различных патологических состояниях.

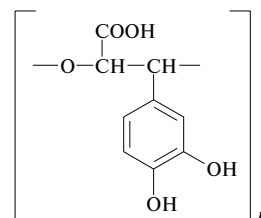
АФК, образованные активированными полиморфноядерными нейтрофилами (ПМН) в процессе фагоцитоза: супероксид анионы ($\cdot\text{O}_2^-$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильные радикалы ($\cdot\text{OH}$) и хлорноватистая кислота (HClO) — играют важную роль в защите организма от чужеродных микроорганизмов [1]. Однако, когда активированные ПМН начинают вырабатывать избыточное количество кислорода при т.н. дыхательном или окислительном взрыве [2, 3] выработка АФК происходит как внутри клетки (фагосомы), так и вне её, что приводит к повреждению окружающей ткани [4, 5].

Увеличение содержания АФК может наблюдаться и при хронических повреждениях, когда в результате ишемического состояния происходит превращение фермента ксантин-дегидрогеназы в ксантин-оксидазу (КО), которая, в свою очередь, катализирует превращение кислорода в супероксид-анионы, вызывающие повреждения ткани. Во время этого процесса КО превращает гипоксантин (ГК) в ксантин и далее в мочевую кислоту.

Следовательно, при лечении раневых и воспалительных процессов связывание супероксид-анионов, образованных как в результате активации ПМН, так и посредством КО, имеет большое значение [6].

Система комплемента ответственна за инициацию воспалительного процесса, опсонизацию и разрушение клеточных мембран антигенных частиц (включая микроорганизмы). Однако биологическая активность комплемента не всегда полезна. В случае аутоиммунных нарушений (образование комплексов аутоантиген – антитело) активность комплемента может стать причиной серьезных повреждений ткани [7].

Ранее [8 – 10] мы сообщали о получении четырех водорастворимых высокомолекулярных (> 1000 кДа) фракций из корней и стеблей *Symphytum asperum* и *S. caucasicum* — ВФК-SA, ВФК-SC и ВФС-SA, ВФС-SC, соответственно. Согласно данным ИК- и ЯМР-спектроскопии основным компонентом этих фракций оказался поли[окси-1-карбокси-2-(3,4-дигидроксифенил)этилен] — представитель нового класса природных простых полиэфиrow с остатком 3-(3,4-дигидроксифенил)глицериновой кислоты в качестве повторяющегося звена [10 – 12]:



Поли[3-(3,4-дигидроксифенил)глицериновая кислота] из *S. asperum* и *S. caucasicum*

В представленной работе сообщается об антикомплементарном действии ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC, и об их способности блокировать образование АФК.

Экспериментальная часть

Реактивы. Сбалансированный солевой раствор Хенкса (CCPX) — Life Technologies, Paisley, Scotland. Зимозан А, форболмиристагетат (ФМА), 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион (люминол), бис-N-метилакридина нитрат (люцигенин), ГК, КО, супероксид-дисмутаза (СОД) — Sigma, USA.

Опсонизированный зимозан (ОПЗ), использующийся в качестве модельной системы для опсонизированных микроорганизмов, состоит из клеточных стенок пекарских дрожжей, покрытых иммуноглобулином

IGg, манноза-связывающим лектином и фрагментом C₃b(i) комплемента [13]. ОПЗ получали инкубацией отмытого зимозана А с разбавленной в соотношении 1:10 человеческой сывороткой при 37 °С в течение 30 мин. После отмывки опсонизированный продукт ресуспендировали в ССРХ (конечная концентрация составляла 0,8 мг/мл). ФМА, растворенный в диметилсульфоксиде, хранили при –20 °С и довели в ССРХ до конечной концентрации 40 нМ непосредственно перед употреблением [14].

Определение антикомплементарной активности. Антикомплементарную активность исследуемых фракций определяли методами, описанными в [15, 16], и выражали в концентрациях (IC₅₀ мкг/мл), вызывавших 50 % ингибирование гемолиза.

Определение продукции АФК. Нейтрофилы выделяли из венозной крови здоровых добровольцев (Bloedbank Midden-Nederland, Utrecht, The Netherlands) по методике, описанной в [17]. На белой 96-ячеечной плоскодонной пластине микротитратора (Costar, Badhoevedorp, The Netherlands) исследуемые образцы последовательно разбавляли до конечного объема 50 мкл. В каждую ячейку добавляли по 50 мкл суспензии нейтрофилов (1 · 10⁷ клеток/мл) и 50 мкл растворов люминола (120 мкМ) или люцигенина (400 мкМ). Нейтрофилы активировали, прибавляя 50 мкл ОПЗ (конечная концентрация: 200 мкг/мл) или ФМА (конечная концентрация 10 нМ). Хемилюминесценцию проверяли в течение 30 мин (каждые 2 мин по 0,5 с), используя люминометр Titertek Luminoskan (TechGen International, Zellik, Belgium). Активность исследуемых образцов относительно соответствующего контроля (идентичные инкубации без испытуемого образца) определяли по пиковым концентрациям. Эксперименты проводили в ССРХ забуференном NaHCO₃ до рН 7,35 с добавлением 0,1 % желатина (ССРХ-гель), во избежание агрегации клеток [14].

Связывание супероксид-анионов / Ингибирующая активность КО. На белой 96-ячеечной пластине плоскодонного микротитратора (Costar) исследуемые образцы последовательно разбавляли в забуференном фосфатом физиологическом растворе (БФФР) (рН 7,4) до конечного объема 50 мкл. После этого добавляли ГК (50 мкл; 4 мМ), люцигенин (50 мкл; 0,4 мМ), и буфер (БФФР; 25 мкл) или СОД (25 мкл; 80 ЕД/мл). Образование супероксид-аниона инициировали добавле-

нием 25 мкл КО (80 мЕД/мл) и сгенерированный сигнал хемилюминесценции измеряли в течение 15 мин (каждую минуту по 0,5 с), используя люминометр Titertek Luminoskan. Активность испытуемых веществ относительно контроля определяли по их концентрациям (IC₅₀ мкг/мл), вызывавшим 50 % уменьшение сигнала хемилюминесценции ингибированной части СОД [14].

Результаты и их обсуждение

Результаты, полученные при изучении действия ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC на систему комплемента, приведены в табл. 1.

Антикомплементарная активность ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC может быть объяснена их полифенольной природой и блокированием конвертаз комплемента за счет образования комплекса фенольный полимер – белок.

Способность ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC ингибировать продукцию АФК человеческими ПМН, вызванную двумя различными стимулирующими агентами: рецептор-зависимым ОПЗ [18] или рецептор-независимым ФМА [19], — изучалась путем измерения люминол- или люцигенин-усиленной хемилюминесценции (ХЛ_{люм} и ХЛ_{люц}, соответственно).

При использовании люминола обнаруживается, главным образом, хлорноватистая кислота, тогда как люцигенин более специфичен для супероксид-анионов. С помощью люминола, как известно, можно обнаружить как внутри-, так и внеклеточную продукцию АФК [20], тогда как область приложения люцигенина — только внеклеточное пространство, из-за того, что ПМН практически непроницаемы для люцигенина [21].

Для того чтобы разграничить процессы ингибирования продукции АФК от их связывания, был проведен тест, в котором супероксид-анионы генерировались в бесклеточной ГК/КО системе и определялась их ХЛ_{люц} [14].

Действие ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA, ВФС-SC на ХЛ_{люм} и ХЛ_{люц}, генерированную ОПЗ- и ФМА-стимулированными ПМН, а также на ХЛ_{люц}, вызванную продукцией супероксид-аниона в бесклеточной ГК/КО системе, показано в табл. 2.

Таблица 1
Ингибирующее действие ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC на активность комплемента

Фракция	IC ₅₀ (мкг/мл)*	
	классический путь	альтернативный путь
ВФК-SA	0,8 ± 0,1	15,3 ± 2,3
ВФК-SC	0,6 ± 0,1	14,2 ± 3,6
ВФС-SA	1,5 ± 0,3	23,0 ± 3,0
ВФС-SC	0,7 ± 0,2	17,0 ± 4,5

* Среднее арифметическое (n = 6) ± стандартная ошибка среднего

Таблица 2
Антиоксидантная активность ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC

Фракция	IC ₅₀ (мкг/мл)*			
	ХЛ _{люм} ОПЗ-стимулированных ПМН	ХЛ _{люц} ОПЗ-стимулированных ПМН	ХЛ _{люц} ФМА-стимулированных ПМН	ХЛ _{люц} в системе ГК/КО
ВФК-SA	79,6 ± 4,0	82,0 ± 9,4	74,6 ± 10,7	2,0 ± 0,8
ВФК-SC	150,5 ± 22,8	108,6 ± 10,8	104,5 ± 20,4	3,2 ± 0,7
ВФС-SA	113,0 ± 16,4	66,5 ± 7,0	107,4 ± 20,5	0,75 ± 0,3
ВФС-SC	149,6 ± 20,4	113,0 ± 6,0	170,7 ± 16,3	3,0 ± 0,9

* Среднее арифметическое (n = 6) ± стандартная ошибка среднего

ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC обладают выраженной антиоксидантной активностью, проявившейся в ингибировании ХЛ_{люц}, вызванной образованием супероксид-аниона в бесклеточной ГК/КО системе. Однако уменьшение ХЛ_{люц} или ХЛ_{люм}, вызванной ОПЗ- или ФМА-стимулированными ПМН, оказалось слабее, чем могло ожидать при использовании светового усилителя, особенно такого, как люцигенин, который специфически обнаруживает супероксид-анионы. Ввиду того, что все исследованные фракции имеют молекулярную массу >1000 кДа, возможно, что эти большие молекулы сами по себе вызывают активацию ПМН. Так, помимо хемилюминесценции, вызванной ОПЗ- или ФМА-стимулированными ПМН, дополнительная активация ПМН с помощью ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC привела бы к увеличению хемилюминесценции, и, следовательно, к снижению ингибирующей активности (увеличению IC₅₀).

Нельзя исключить и возможность инактивации КО под действием ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC на том основании, что их доминирующим компонентом является фенольный полимер, который, вероятно, легко связывается с белками, инактивируя ферменты типа КО и конвертаз комплемента. Необходимо отметить, что КО является ферментом, ответственным за образование не только АФК, но и мочевой кислоты, определяющей болезненное воспаление в суставах (например при подагре) [22, 23]. Кроме того, известно, что ингибиторы КО могут связывать супероксид радикалы [24].

Для разграничения связывания супероксид-анионов от инактивации КО обычно спектрофотометрически определяется образование мочевой кислоты (λ_{\max} 290 нм), что в нашем случае оказалось невозможным, так как указанные фракции сами имеют максимум поглощения в том же диапазоне (λ_{\max} 286 нм).

Фенольные полимеры ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC представляют собой поликатехоловые кислоты и, благодаря присутствию *o*-дигидроксильных (катехольных) групп, могут действовать в качестве доноров водородных радикалов или электронов, что является решающим для повышенной антиоксидантной активности. Следовательно, наблюдаемое подавление хемилюминесценции под действием ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC (табл. 2) может быть результатом уменьшения концентрации АФК.

Сходство биологической активности ВФК-SA, ВФК-SC, ВФС-SA и ВФС-SC легко объясняется близостью их химической природы [10 – 12]. Вероятно, с фенольной структурой связано наличие у них сильных антиоксидантных свойств и наблюдаемая инактивация конвертаз комплемента и КО.

Благодаря наличию только простой эфирной связи, основным преимуществом данного полимера является его слабая подверженность гидролизу, и, соответственно, высокая стабильность.

Таким образом, антиоксидантная и антикомплементарная активность поли [3-(3,4-дигидроксифенил)гли-

цериновой кислоты] из корней и стеблей *S. asperum* и *S. caucasicum* свидетельствует о том, что названный полимер является потенциальным противовоспалительным, вазопротекторным и ранозаживляющим агентом и может быть использован в качестве действующего начала при разработке терапевтических средств для лечения сосудистых заболеваний, ран различной этиологии, а также воспалительных процессов, вызванных свободными радикалами или ферментами.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. B. Hampton, J. Kettle, and C. Winterbourn, *Blood*, **92**, 3007 – 30017 (1998).
2. B. M. Babior, *New Engl. J. Med.*, **298**, 659 – 668 (1978).
3. B. M. Babior, *Curr. Opin. Hematol.*, **2**, 55 – 60 (1995).
4. S. J. Weiss, *New Engl. J. Med.*, **320**(6), 365 – 376 (1989).
5. H. L. Malech and J. I. Gallin, *New Engl. J. Med.*, **317**(11), 687 – 694 (1987).
6. B. Latha and M. Babu, *Burns*, **27**, 309 – 317 (2001).
7. I. Roitt, J. Brostoff, and D. Male, in: *Immunology: Complement*, Fourth Edition, Mosby, London, Madrid, et sat. (1996), 13.1 – 13.16.
8. V. V. Barbakadze, E. P. Kemertelidze, A. I. Usov, et al., *Proc. Georgian Acad. Sci. Biol. Ser.*, **25**(4 – 6), 207 – 216 (1999).
9. V. Barbakadze, E. Kemertelidze, I. Targamadze, et al., *Trans-Caucasian J. Immunol.*, **1**(2), 21 – 35 (1999).
10. В. Барбакадзе, Э. Кемертелидзе, И. Таргамадзе и др., *Химия природ. соедин.*, № 4, 303 – 305 (2005).
11. V. V. Barbakadze, E. P. Kemertelidze, A. S. Shashkov, and A. I. Usov, *Mendeleev Commun.*, **10**(4), 148 – 149 (2000).
12. В. В. Барбакадзе, Э. П. Кемертелидзе, И. Л. Таргамадзе и др., *Биоорганическая химия*, **28**(4), 362 – 366 (2002) [*Russian J. Bioorg. Chem. (Engl. transl.)*, **28**(4), 326 – 330 (2002)].
13. D. Roos, A. A. M. Bot, M. L. J. van Schaik, et al., *J. Immunol.*, **126**(2), 433 – 440 (1981).
14. E. van den Worm, C. J. Beukelman, A. J. J. van den Berg, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **433**, 225 – 230 (2001).
15. J. P. A. M. Klerx, C. J. Beukelman, H. van Dijk, and H. J. M. N. Willers, *J. Immunol. Methods.*, **63**, 215 – 220 (1983).
16. J. M. Simons, L. A. 't Hart, H. van Dijk, et al., *Ethnopharmacol.*, **26**, 169 – 182 (1989).
17. H. A. Verbrugh, R. Peters, P. K. Peterson, and J. Verhoef, *J. Clin. Pathol.*, **31**, 539 – 545 (1978).
18. J. C. Whitin, D. H. Ryan, and H. J. Cohen, *Blood*, **66**(5), 1182 – 1188 (1985).
19. N. Schnitzler, K. Schweizer, A. Podbielski, et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **418**, 897 – 902 (1997).
20. C. Dahlgren, P. Follin, A. Johansson, et al., *J. Biol. Chem.*, **4**, 263 – 266 (1989).
21. C. Dahlgren, H. Aniansson, and K. E. Magnusson, *Infect. Immun.*, **47**, 326 – 328 (1985).
22. J. M. McCord and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **243**(21), 5753 – 5760 (1968).
23. H. C. Chiang, Y. J. Lo, and F. J. Lu, *J. Enzyme Inhib.*, **8**(1), 61 – 71 (1994).
24. J. E. Chung, M. Kurisawa, Y.-J. Kim, et al., *Biomacromolecules*, **5**, 113 – 118 (2004).

Поступила 20.09.05

**ANTIOXIDANT AND ANTICOMPLEMENTARY ACTIVITY
OF POLY[3-(3, 4-DIHYDROXYPHENYL)GLYCERIC ACID]
FROM *Symphytum asperum* and *Symphytum Caucasicum***

V. V. Barbakadze¹, E. P. Kertemelidze¹, K. G. Mulkidzhanyan¹, A. J. J. van den Berg²,
K. J. Bjukelman², E. van den Vorm², G. K. Kverles van Ufford², and A. I. Usov³

¹ Kutateladze Institute of Pharmaceutical Chemistry, Academy of Sciences of Georgia, Tbilisi, Republic of Georgia;

² Utrecht University, Utrecht, The Netherlands;

³ Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

Four water-soluble high-molecular (>1000 kDa) preparations from the roots and stems of *Symphytum asperum* and *Symphytum caucasicum*, in which the principal component is poly[oxy-1-carboxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethylene], exhibit significant anticomplementary and antioxidant activity and inhibit reactive oxygen species (ROS), either by directly influencing their production by the polymorphonuclear neutrophils, or by scavenging these ROS. The high anticomplementary and antioxidant properties make this polymer a potential antiinflammatory, vasoprotective, and wound-healing agent