

© Коллектив авторов, 2010

В. В. Барбакадзе, К. Г. Мулкиджанян, М. И. Мерлани, Л. М. Гоглашвили, Л. Ш. Амиранашвили, Е. К. Шабуришвили

ВЫДЕЛЕНИЕ, СОСТАВ, АНТИОКСИДАНТНАЯ И АНТИКОМПЛЕМЕНТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФРАКЦИЙ ЛИСТЬЕВ *SYMPHYTUM ASPERUM* И *S. CAUCASICUM*

Институт фармакохимии им. И. Г. Кутателадзе, Тбилиси, Грузия, vbarb@narod.ru

Высокомолекулярные фракции (> 1000 кДа) листьев *Symphytum asperum* и *S. caucasicum* проявили антикомплементарную активность, способность ингибировать люминол- и люцигенин-зависимую хемиллюминесценцию (ХЛ_{люм} и ХЛ_{люц} соответственно), вызванную человеческими полиморфноядерными нейтрофилами (ПМН) после их стимуляции опсонизированным зимозаном, а также уменьшать сигнал ХЛ_{люц}, вызванный образованием супероксиданиона в бесклеточной системе гипоксантин/ксантинооксидаза. Антикомплементарное и антиоксидантное действие высокомолекулярных (> 1000 кДа) фракций листьев *S. asperum* и *S. caucasicum* указывает на возможность использования их в качестве противовоспалительных и ранозаживляющих агентов.

Ключевые слова: *Symphytum asperum*, *S. caucasicum*, антикомплементарная и антиоксидантная активность, ингибирование хемиллюминесценции.

В остром воспалительном тесте на мышцах, суммы полисахаридов из корней, стеблей и листьев *Symphytum asperum* показали выраженное антиэкссудативное действие [1]. Ранее из суммарных полисахаридов корней [2] и стеблей [3] *S. asperum* и *S. caucasicum* были выделены 4 водорастворимые высокомолекулярные (> 1000 кДа) фракции. Согласно данным ИК- и ЯМР-спектров главным химическим компонентом всех 4 фракций оказался регулярно замещенный полиоксиэтилен, а именно, поли[окси-1-карбоксит-2-(3,4-дигидроксифенил)этилен] [3–6]. Этот ранее неизвестный природный фенольный биополимер с остатком 3-(3,4-дигидроксифенил)глицериновой кислоты в качестве повторяющегося звена был выделен впервые и является представителем нового класса природных простых полиэфиров. Установлены высокая антикомплементарная активность [2, 7], антиоксидантные и противовоспалительные свойства [6–8] этого полимера.

Во время фагоцитоза стимулируемые полиморфноядерные нейтрофилы (ПМН) вырабатывают активные формы кислорода (АФК): супероксид анионы ($\cdot\text{O}_2^-$), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильные радикалы ($\cdot\text{OH}$), и хлорноватистую кислоту (НСЮ), которые играют важную роль в защите хозяина от микроорганизмов [9]. Производство АФК происходит не только в клетке (фагосоме), но и вне ее, вызывая повреждение окружающей ткани [10, 11].

Помимо появления супероксид анионов в результате стимуляции ПМН, эти радикалы могут также возникать при хроническом течении раневого процесса, когда в результате ишемии фермент ксантиндегидро-

геназа превращается в ксантинооксидазу (КО), которая, в свою очередь, переводит кислород в супероксид анионы, вызывающие повреждение ткани. Во время этого процесса КО преобразовывает гипоксантин (ГК) в ксантин и далее в мочевую кислоту. Поэтому утилизация супероксид анионов, как выработанных ПМН, так и образующихся в результате действия КО, может быть использована для лечения ран и воспаления [12].

Система комплемента представляет собой один из первичных гуморальных механизмов защиты хозяина. Функции комплемента включают инициацию воспаления, опсонизацию антигенных частиц (включая микроорганизмы) и повреждение мембран болезнетворных микроорганизмов. Однако биологическая активность комплемента не всегда оказывается полезной. Так, при аутоиммунных нарушениях, включая образование комплекса аутоантиген-антитело, активность комплемента может вызвать серьезное повреждение ткани [13].

Природные соединения, которые могут влиять на продукцию АФК и деятельность системы комплемента, могут оказаться полезными инструментами для предотвращения разрушения ткани, ускоряя процесс ранозаживления и ликвидации воспаления.

Кавказские виды рода *Symphytum* использовались в грузинской народной медицине для обработки ран, а также при лечении язв и ревматического артрита [14]. Известно, что нарушение иммунного ответа может инициировать хроническое воспаление, в частности, при ревматическом артрите [15]. Поэтому для исследования лечебных свойств препаратов *Symphytum*

были использованы тесты, связанные с процессом иммуномодуляции.

Целью данного исследования явилось выделение водорастворимых высокомолекулярных (> 1000 кДа) фракций из сумм полисахаридов листьев *S. asperum* (ВМФ-ЛСА) и *S. caucasicum* (ВМФ-ЛСC), и проведение предварительного исследования их химического состава. Кроме того, приводятся данные об ингибирующем действии ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC на активность комплемента, на выработку АФК стимулированными ПМН, а также генерацию супероксид аниона в бесклеточной системе ГК/КО.

Экспериментальная химическая часть

Выделение суммы полисахаридов. Суммы полисахаридов листьев *S. asperum* и *S. caucasicum* (соответственно 10,0 и 7,1 % от воздушно-сухой массы листьев) были получены, как описано ранее [16, 17].

Выделение ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC. ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC из суммарных полисахаридов листьев *S. asperum* и *S. caucasicum* выделяли ультрафильтрацией на мембранных фильтрах (величина отсеки 1000 кДа), как описано в [2]. Выход ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC, составил 34,7 и 31,7 % соответственно от суммы полисахаридов и 3,5 и 2,5 % соответственно от воздушно-сухой массы листьев.

Определение углеводного состава ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC. Фруктозу [18] и уоновую кислоту [19] определяли колориметрически. Другие монозы анализировали после гидролиза образцов (5 мг каждый) в 2М CF_3COOH в течение 1,5 ч при 121 °С. Сахара переводили в ацетаты полиолов и определяли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ), используя мио-инозит в качестве внутреннего стандарта [16, 17]. ГЖХ проводили на газожидкостном хроматографе Hewlett Packard 5890 (США) с пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой (Ultra-1) и интегратором HP 3393 А (США). Газ-носитель — N_2 . Условия хроматографирования: 175 °С (1 мин) \rightarrow 290 °С (10 °С/мин).

УФ, ИК и ^1H ЯМР спектроскопия ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC. УФ-спектры сняты на спектрофотометре Hitachi 150 – 20 (Япония); ИК-спектры — в таблетках KBr на спектрофотометре Jasco FT/IR-410 (Япония); ^1H ЯМР-спектры 1 % растворов в D_2O — на спектрометре Varian Unity Inova 500 (США) (рабочая частота 500,13 МГц для ^1H) при 70 – 80 °С с использованием ацетона в качестве внутреннего стандарта (δ_{H} 2,225 м.д. от Me_4Si).

Спектральные данные: а) УФ-спектры (H_2O), ν_{max} , нм: ВМФ-ЛСА– 213, 238; ВМФ-ЛСC– 213, 238. б) ИК-спектры, ν_{max} , cm^{-1} : ВМФ-ЛСА– 3388 (ОН); 2934 (СН); 1608 (СОО $^-$), 1419, 1262, 1235, 098, 892; ВМФ-ЛСC– 3386 (ОН); 2933(СН); 1610 (СОО $^-$), 1416, 1260, 1237, 1096, 890. в) ^1H ЯМР-спектры, δ_{H} , м.д.: ВМФ-ЛСА– 5,78, 5,32, 5,26, 5,2, 5,154, 5,12, 5,107, 5,084, 4,94, 4,68, 4,605, 4,464, 4,422; ВМФ-ЛСC —

5,785, 5,385, 5,254, 5,207, 5,179, 5,149, 5,102, 5,076, 4,951, 4,693, 4,626, 4,461.

Экспериментальная биологическая часть

Материалы для определения антиоксидантной активности. Сбалансированный солевой раствор Хенкса (ССРХ) был получен от Life Technologies (Пейсли, Шотландия). Zymosan А, 5-амино-2,3-дигидрофталазин-1,4-дион (люминол), бис-N-метилакридида на нитрат (люцигенин), ГК, КО, супероксиддисмутаза (СОД) и остальные реактивы приобретены в Sigma (Сент-Луис, МО, США).

Опсонизированный зимозан (ОПЗ), используемый как модельная система для опсонизированных микроорганизмов, состоит из клеточных оболочек хлебопекарных дрожжей, покрытых иммуноглобулином IgG, манноза-связываемым лектином и фрагментом С3b(i) комплемента [20]. ОПЗ был получен 30-минутной инкубацией при 37 °С отмытого коммерческого зимозана с разбавленной 1:10 человеческой сывороткой. После отмывки опсонизированный продукт повторно суспендировали в растворе Хенкса (заключительная концентрация 0,8 мг/мл) [21].

Определение генерации АФК. Нейтрофилы выделялись из венозной крови здоровых добровольцев, как описано в [22]. На 96-ячеечной белой плоскодонной микротитровочной пластине (Costar, Badhoevedorp, Нидерланды), вещества серийно разводили до заключительного объема 50 мкл. В каждую ячейку добавляли 50 мкл суспензии нейтрофилов ($1 \cdot 10^7$ клеток/мл) и 50 мкл люминола (120 мкМ) или люцигенина (400 мкМ). Нейтрофилы активировали добавлением 50 мкл ОПЗ (конечная концентрация 200 мкг/мл) и хемилюминесценцию измеряли каждые 2 мин по 0,5 с в течение 30 мин, используя люциметр Titertek Luminoskan (TechGen International, Zellik, Бельгия). Пиковые уровни использовались для определения активности испытываемых образцов относительно соответствующего контроля (идентичные инкубации без тестируемого образца). Эксперименты были выполнены в сбалансированном солевом растворе Хенкса (ССРХ) забуференном NaHCO_3 до pH 7,35 с добавлением 0,1 % (по объему) желатина во избежание слипания клеток (ССРХ-гель) [21].

Связывание супероксидрадикалов / Ингибирование активности КО. На 96-ячеечной белой плоскодонной микротитровочной пластине (Costar, Badhoevedorp, Нидерланды) тестируемые соединения были последовательно разведены в забуференном фосфатом физиологическом растворе (БФФР) (pH 7,4) до конечного объема 50 мкл. После этого добавляли гипоксантин (50 мкл; 4 мМ), люцигенин (50 мкл; 0,4 мМ) и БФФР (25 мкл) или СОД (25 мкл; 80 ЕД/ml). Активность испытываемых веществ относительно контроля определяли по их концентрациям (IC_{50} мкг/мл), вызывавшим 50 % уменьшение сигнала хемилюминесценции ингибированной части СОД [21].

Моносахаридный состав ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC

Фракция	Общие сахара, %	Моносахариды, %						
		Рамноза	Арабиноза	Ксилоза	Глюкоза	Галактоза	Фруктоза	Уроновая кислота
ВМФ-ЛСА	11,6	0,6	1,2	0,2	0,25	1,0	1,8	6,5
ВМФ-ЛСC	16,0	0,9	1,4	0,2	0,2	1,2	2,3	9,8

Определение антикомплементарной активности. Активности комплемента по классическому (СР) и альтернативному (АР) пути исследуемых фракций определяли методами, подробно описанными в [23, 24], и выражали в концентрациях (IC₅₀, мкг/мл), вызывавших 50 % ингибирование гемолиза.

Результаты и их обсуждение

Предварительная химическая характеристика ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC показала присутствие некоторых полисахаридов. В табл. 1 приводятся данные по общим остаточным сахарам и моносахаридному составу ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC.

ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC так же, как и исходные суммы полисахаридов, содержат доминирующее количество уроновой кислоты и незначительное количество фруктозы и других моноз [17].

УФ-спектры высокомолекулярных (> 1000 кДа) фракций корней и стеблей *S. asperum* и *S. caucasicum* содержали максимумы поглощения при 213, 237, 282 (плечо), и 286 нм в воде [3, 6]. В УФ спектрах ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC максимумы поглощения при 282 и 286 нм отсутствовали.

ИК спектры ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСА были практически идентичны, но отличались от спектров аналогичных высокомолекулярных фракций (> 1000 кДа) корней и стеблей *S. asperum* и *S. caucasicum*, которые были типичны для фенолкарбоновых кислот [3 – 6].

¹H ЯМР спектры ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC содержали соответственно 13 и 12 сигналов, которые к сожалению уширены, поэтому оказалось невозможно определить константы спин-спинового взаимодействия. Они были более сложными, чем спектры аналогичных высокомолекулярных фракций (> 1000 кДа) стеблей и корней *S. asperum* и *S. caucasicum*. В последних имеется 4 сигнала при 4,88, 5,33, 7,13 и 7,24 м.д. Два сигнала с химическими сдвигами 4,88, 5,33 м.д. принадлежат протонам, связанным с разными алифатическими

атомами углерода, соединенными с кислородом. Сигнал с химическим сдвигом 7,13 м.д. был отнесен к 2 соседним водородным атомам в ароматическом кольце. Сигнал с химическим сдвигом 7,24 м.д. принадлежит 1 изолированному водородному атому в ароматическом кольце. Примечательно, что сигналы от водородных атомов ароматического кольца (6,0 – 8,0 м.д.) [25] не наблюдаются в ¹H ЯМР спектрах ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC.

Таким образом, УФ-, ИК- и ¹H ЯМР-спектры ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC практически идентичны друг другу, но отличаются от спектров высокомолекулярных (> 1000 кДа) фракций корней и стеблей *S. asperum* и *S. caucasicum*. Ранее было установлено, что главным компонентом этих фракций корней и стеблей является поли [3-(3, 4-дигидроксифенил)глицериновая кислота] [3 – 6]. Согласно вышеупомянутым спектральным данным мы не смогли обнаружить поли [3-(3, 4-дигидроксифенил)глицериновую кислоту] в ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC. Присутствие этого необычного биополимера в корнях и стеблях и его отсутствие в листьях интересно с биогенетической точки зрения.

Исследование химических составов ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC является специальной задачей и будет предметом дальнейшей работы.

Как видно из данных, приведенных в табл. 2 и 3 соответственно, ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC проявляют антикомплементарную и антиоксидантную активность путем как непосредственного влияния на выработку ПМН, так и/или связывания уже образовавшихся АФК.

Таким образом, антикомплементарная и антиоксидантная активность ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC указывают на возможность их использования в качестве противовоспалительных и ранозаживляющих агентов при лечении ран различной этиологии.

Таблица 2
Ингибирующее действие ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC на систему комплемента

Фракция	IC ₅₀ , мкг/мл*	
	СР	АР
ВМФ-ЛСА	2,7 ± 0,3	69,0 ± 3,0
ВМФ-ЛСC	1,8 ± 0,1	54,0 ± 4,5

* M ± m (n = 6)

Таблица 3
Антиоксидантная активность ВМФ-ЛСА и ВМФ-ЛСC

Фракция	IC ₅₀ , мкг/мл*		
	ХЛ _{люц} мулированных ПМН	ОПЗ-сти мулированных ПМН	ХЛ _{люц} в системе ГК/КО
ВМФ-ЛСА	52,0 ± 3,3	27,0 ± 3,3	1,2 ± 0,3
ВМФ-ЛСC	58,0 ± 4,3	31,0 ± 3,8	1,5 ± 0,5

* M ± m (n = 6)

Упомянувшееся выше лечебное действие листьев, корней и стеблей *Symphytum* должно быть связано с высокомолекулярными (> 1000 кДа) компонентами.

Работа выполнена в рамках Грузино-Американской двусторонней грантовой программы III 2006 (№ GEB2-3344-TB-06).

ЛИТЕРАТУРА

1. G. Abuladze, V. Barbakadze, and K. Mulkijanyan, *Proc. Georgian Acad. Sci., Biol. Ser.*, **21**(16), 129 – 132 (1995).
2. V. V. Barbakadze, E. P. Kemertelidze, A. I. Usov, et al., *Proc. Georgian Acad. Sci. Biol. Ser.*, **25**(4–6), 207 – 216 (1999).
3. В. Барбакадзе, Э. Кемертелидзе, И. Таргамдзе и др., *Химия природ. соедин.*, № 4, 303 – 305 (2005).
4. V. V. Barbakadze, E. P. Kemertelidze, A. S. Shashkov, and A. I. Usov, *Mendeleev Commun.*, **10**(4), 148 – 149 (2000).
5. В. В. Барбакадзе, Э. П. Кемертелидзе, И. Л. Таргамдзе и др., *Биоорган. химия*, **28**(4), 362 – 366 (2002).
6. V. Barbakadze, E. Kemertelidze, I. Targamadze, et al., *Molecules*, **10**(9), 1135 – 1144 (2005).
7. В. В. Барбакадзе, Э. П. Кемертелидзе, К. Г. Мулкиджанян и др., *Хим.-фарм. журн.*, **41**(1), 14 – 17 (2007).
8. C. M. Barthomeuf, E. Debiton, V. V. Barbakadze, and E. P. Kemertelidze, *J. Agric. Food Chem.*, **49**(8), 3942 – 3946 (2001).
9. M. B. Hampton, A. J. Kettle, and C. C. Winterbourn, *Blood*, **92**(9), 3007 – 3017 (1998).
10. B. M. Babior, *Cur. Opin. Hematol.*, **2**, 55 – 60 (1995).
11. S. J. Weiss, *New Engl. J. Med.*, **320**(6), 320 – 376 (1989).
12. B. Latha, and M. Babu, *Burns*, **27**, 709 – 317 (2001).
13. I. Roitt, J. Brostoff, D. Male, in: *Immunology: Complement*, Fourth Edition, Mosby, London, Madrid, etc. (1996), 13.1 – 13.17.
14. Ts. N. Gviniashvili, in: *The Caucasian species of the genus *Symphytum L.**, Metsniereba, Tbilisi (1976), pp. 130 – 135.
15. F. M. van den Dungen, in: *Ph. D. Thesis: *Symphytum, officinale L.*: Influence on immune functions and wound-healing processes*, Utrecht University, Utrecht (1993).
16. В. В. Барбакадзе, Р. А. Гахокидзе, З. С. Шенгелия и А. И. Усов, *Химия природ. соедин.*, № 3, 330 – 335 (1989); [*Chem. Nat. Compd. (Engl. Transl.)*, **25**(3), 281 – 286 (1989)].
17. В. В. Барбакадзе, Э. П. Кемертелидзе, Г. Е. Деканосидзе и др., *Биоорган. химия*, **18**(5), 671 – 679 (1992).
18. W. Yaphe and G. P. Arsenaault, *Anal. Biochem.*, **13**(1), 143 – 148 (1965).
19. N. Blumenkrantz and G. Asboe-Hansen, *Anal. Biochem.*, **54**(2), 484 – 489 (1973).
20. D. Roos, A. A. M. Bot, M. L. J. van Schaik, et al., *J. Immunol.*, **126**(2) 433 – 440 (1981).
21. E. van den Worm, C. J. Beukelman, A. J. J. van den Berg, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **433**, 225 – 230 (2001).
22. H. A. Verbrugh, R. Peters, P. K. Peterson, and J. Verhoef, *J. Clin. Pathol.*, **31**, 539 – 545 (1978).
23. J. P. A. M. Klerx, C. J. Beukelman, H. van Dijk, and J. M. N. Willers, *J. Immunol. Methods*, **63**, 215 – 220 (1983).
24. J. M. Simons, L. A. 't Hart, H. van Dijk, et al., *J. Ethnopharmacol.*, **26**, 169 – 182 (1989).
25. K. M. Markham, in: *Techniques of flavonoid identification*, Academic Press, London, New York, etc (1982), pp. 72 – 78.

Поступила 06.03.08

ISOLATION, COMPOSITION, ANTIOXIDATIVE AND ANTICOMPLEMENTARY ACTIVITY OF HIGH-MOLECULAR FRACTIONS FROM LEAVES OF *SYMPHYTUM ASPERUM* AND *SYMPHYTUM CAUCASICUM*

V. Barbakadze*, K. Mulkijanyan, M. Merlani, L. Gogilashvili, L. Amiranashvili, and E. Shaburishvili

Kutateladze Institute of Pharmacochimistry, Tbilisi, Georgia;

* e-mail: vbarb@narod.ru

High-molecular (1000 kDa) fractions isolated from the leaves of *Symphytum asperum* and *S. caucasicum* displayed anticomplementary activity, inhibition of luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence (CLlum) and CLluc, respectively) generated by opsonized zymosan-stimulated human polymorphonuclear neutrophils (PMNs), and inhibition of CLluc signal resulting from superoxide anion generation by the cell-free hypoxanthine/xanthineoxidase system. The anticomplementary and antioxidant properties of high-molecular (>1000 kDa) fractions of *S. asperum* and *S. caucasicum* leaves point to these preparations as potential anti-inflammatory and wound-healing agents.

Key words: *Symphytum asperum*, *S. caucasicum*, anticomplementary and antioxidant activity, inhibition of chemiluminescence