

ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН ПРОЯВЛЯЕТ ГЕНОПРОТЕКТОРНЫЕ И РАДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА

Шелковская О. В.^{1,2}, Иванов В. Е.¹, Карп О. Э.¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуцино, Россия (142290, Московская обл., г. Пуцино, ул. Институтская, 3), e-mail: olya_shelkovskaya@mail.ru

²Пуцинский государственный естественно-научный институт, Пуцино, Россия (142290, Московская обл., г. Пуцино, просп. Науки, 3)

С помощью микроядерного теста исследовано влияние дигидрокверцетина (тахсифолина) на образование полихроматофильных эритроцитов с микроядрами в красном костном мозге самцов мышей Кв:SHK под действием рентгеновского излучения и на выживаемость мышей после облучения в дозе 7 Гр. Были исследованы различные концентрации дигидрокверцетина: 30, 150 и 300 мг/кг при их внутрибрюшинном введении. Дигидрокверцетин в концентрации 30 мг/кг в микроядерном тесте не оказывает существенное влияние на поврежденную ДНК с образованием микроядер, а в тесте на выживаемость приводит к 100 %-я гибели животных, как и в контрольной группе. Установлено, что дигидрокверцетин в концентрациях 150 и 300 мг/кг уменьшает образование радиационно-индуцированных полихроматофильных эритроцитов с микроядрами на 20 % и 35 % и увеличивает выживаемость животных после воздействия ионизирующей радиации на 20 % и 60 % соответственно. Таким образом установлено, что дигидрокверцетин в концентрациях 150 и 300 мг/кг проявляет защитный эффект при введении мышам *in vivo*.

Ключевые слова: флавоноиды, дигидрокверцетин, генопротектор, радиопротектор, окислительный стресс, активные формы кислорода.

DIHYDROQUERCETIN EXERTS GENOPROTECTIVE AND RADIOPROTECTIVE PROPERTIES

Shelkovskaya O. V.^{1,2}, Ivanov V. E.¹, Karp O. E.¹

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia (142290, Moscow Region, Pushchino, Institutskaya St., 3), e-mail: olya_shelkovskaya@mail.ru

²Pushchino State Research Institute for Natural Sciences, Pushchino, Russia (142290, Moscow Region, Pushchino, Science Ave., 3)

By means of micronucleus test we analyzed effect of dihydroquercetin (taxifolin) on formation of polychromatic erythrocytes with micronuclei in the bone marrow of Кv:SHK male mice the action influence of X-ray, as well as on the survival of these mice after irradiation at a dose of 7 Gy. In this study various concentrations of dihydroquercetin (30, 150 and 300 mg/kg) were investigated. All of them administered intraperitoneally. In the micronucleus test, dihydroquercetin at a concentration of 30 mg/kg does not diminish significantly DNA damage and the formation of micronuclei in the bone marrow test. Survival test with dihydroquercetin results in a 100% death of animals, the same was observed in the control. It was found that dihydroquercetin reduces the formation of radiation-induced polychromatic erythrocytes with micronuclei by 20 % and 35 %, and prolongs survival of animals after exposure to ionizing radiation by 20 % and 60 %. Thus it was established that dihydroquercetin in the concentration of 150 and 300 mg/kg shows a protective effect at administration to the mice *in vivo*.

Keywords: flavonoids, dihydroquercetin, genoprotector, radioprotector, oxidative stress, reactive oxygen species.

Активные формы кислорода (АФК) постоянно образуются в живой клетке как продукты нормального метаболизма кислорода. Воздействие факторов окружающей среды на организм, таких как ионизирующее излучение, УФ-излучения и т.д., также приводит к образованию АФК [1]. Данные химические соединения обладают высокой реакционной способностью, что позволяет им вступать в окислительно-восстановительные реакции с белками, липидами, углеводами и нуклеиновыми кислотами. В ДНК чувствительной

мишенью при действии АФК является гуанин, который в результате окислительного повреждения превращается в 8-оксогуанин [6]. Образование 8-оксогуанина связано с такими процессами, как мутагенез, канцерогенез, старение и т.д. В настоящее время существует много разных радиозащитных веществ, которые способны предотвращать повреждающий эффект ионизирующей радиации. Однако выявление наиболее эффективных из них продолжается [2]. Большинство радиозащитных веществ – биоантиоксиданты [3]. Самыми перспективными являются антиоксиданты природного происхождения, способные модифицировать повреждающий эффект ионизирующего излучения [10, 4]. Флавоноиды – это наиболее изученный класс природных веществ, способные проявлять антиоксидантные, защитные, иммуномодулирующие и другие свойства [8]. Ярким представителем этого класса считается дигидрокверцетин (ДГК) [7]. ДГК впервые был обнаружен в коре ели Дуглоса, а позднее в лиственнице даурской и сибирской. По молекулярному строению и функциям ДГК близок к кверцетину и рутину, но превосходит их по фармакобиологической активности. Ранее было показано, что ДГК проявляет антиоксидантные свойства [7, 9]. Цель данной работы заключалась в исследовании генопротекторных и радиозащитных свойств ДГК в системе *in vivo*.

Материалы и методы исследования

В работе использовали высокоочищенный препарат дигидрокверцетин, любезно предоставленный А.Б. Гавриловым (Пушино, ИПБ РАН ЗАО НПФ «Флавит»), перекись водорода (ХимМед, Россия), Трис(гидрокси-метил)аминометан, 2,2'-азино-ди(3-этил-2,3-дигид-робензотиазолин-6-сульфонат) аммония (ABTS) (Sigma, США), натрий хлористый (AppliChem, Германия), масло иммерсионное (Cargill, США). В работе использованы следующие соли: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Amresco, США).

Облучение. Облучение растворов проводили на рентгеновской терапевтической установке РУТ-15 (15 мА, 200 кВ) (МосРентген, Россия) при мощности дозы 4 Гр/мин (фокусное расстояние 0,195 м) (Центр коллективного пользования ИБК РАН).

Микроядерный тест

Цитогенетические повреждения клеток красного костного мозга мышей определяли по образованию полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ), содержащих микроядра (МЯ). Мышей умерщвляли методом цервикальной дислокации через 28 ч после воздействия (рентгеновское излучение и/или введения раствора дигидрокверцетина). Гистологические препараты готовили по стандартной методике с некоторыми модификациями. При подсчете ПХЭ, содержащих МЯ, использовали световой микроскоп “МикМед-2”(ЛОМО, Спб) с иммерсионным объективом при увеличении $\times 1000$.

Тест на выживаемость

Выживаемость самцов аутбредных мышей Kv: SHK после воздействия рентгеновского излучения определяли ежедневно в течение 30 суток. Дигидрокверцетин в концентрации 30–300 мг/кг живого веса в физиологическом растворе вводили животным внутрибрюшинно перед тотальным рентгеновским облучением в дозе 7 Гр. Контролем служила группа мышей без введения препарата, облученных в дозе 7 Гр.

Результаты и их обсуждения

В Таблице 1 представлено влияние рентгеновского излучения в дозе 1 Гр на уровень поврежденности ДНК клеток красного костного мозга мышей. Из таблицы видно, что после облучения животных процент ПХЭ с МЯ увеличился на 9 раз от $0,42 \pm 0,03$ % при отсутствии воздействия до $3,93 \pm 0,04$ % при дозе 1 Гр. Введение ДГК мышам в концентрациях 30 мг/кг за 15 мин до облучения не оказывает существенного влияния на количество ПХЭ с МЯ. Результаты микроядерного теста для животных этой группы статистически не отличаются относительно контроля облученного в той же дозе. Тогда как при введении ДГК в концентрациях 150 и 300 мг/кг наблюдаются статистически значимые отличия относительно контроля. Введение ДГК в концентрации 150 мг/кг приводит к уменьшению количества ПХЭ с МЯ относительно облученного контроля на 20 %, введение ДГК в концентрации 300 мг/кг приводит к уменьшению количества ПХЭ с МЯ относительно облученного контроля почти на 35 %. Нужно отметить, что введение ДГК интактным мышам не приводило к изменению поврежденности ДНК, то есть дигидрокверцетин не проявляет генотоксические свойства даже при концентрациях 300 мг/кг.

Таблица 1

Влияние ДГК в концентрации 30, 150 и 300 мг/кг при его однократном внутрибрюшинном введении за 15 мин до воздействия рентгеновского облучения в дозе 1 Гр на процентное содержание ПХЭ с МЯ

№	Воздействие	ПХЭ с МЯ, %
1	0 Гр	$0,42 \pm 0,03$
2	ДГК 300 мг/кг + 0Гр	$0,39 \pm 0,04$
3	1 Гр	$3,93 \pm 0,11$
4	ДГК 30 мг/кг + 1Гр	$3,73 \pm 0,12$
5	ДГК 150 мг/кг + 1Гр	$3,22 \pm 0,13$
6	ДГК 300 мг/кг + 1Гр	$2,60 \pm 0,24$

Примечание. Указаны средние значения и их стандартные ошибки (n=5).

Исследовано влияние ДГК на выживаемость мышей при его внутрибрюшинном однократном введении за 15 мин до тотального рентгеновского облучения в летальной дозе 7 Гр (Таблица 2). Эффект ДГК увеличивается при повышении его концентрации. Установлено, что при внутрибрюшинном введении ДГК в концентрации 150 и 300 мг/кг за 15 минут до тотального облучения в дозе 7 Гр, в течение 30 суток выживает 20 % и 60 % животных соответственно при 100 % гибели облученных животных в контрольной группе и при введении ДГК в концентрации 30 мг/кг. Таким образом, установлено, что ДГК проявляет существенные генопротекторные и радиозащитные свойства.

Таблица 2

Влияние ДГК на выживаемость мышей при однократном внутрибрюшинном введении за 15 минут до воздействия рентгеновского излучения в дозе 7 Гр.

Концентрация, мг/кг	Процент выживших к 30 суткам после облучения (количество выживших к 30 суткам / количество животных, участвующих в эксперименте)
30	0 (0/20)
150	20 (4/20)
300	60 (18/30)

Примечание. Каждая экспериментальная группа состояла из 20–30 мышей. $p - 0,05$.

Ранее в лаборатории клеточной инженерии Заичкиной С.И. и ее коллегами было показано, что дигидрохверцетин при диапазоне малых и умеренных доз проявлял защитное действие от цитогенетических порождений в костном мозге [5]. Таким образом, дигидрохверцетин при воздействии рентгеновского излучения проявляет существенные генопротекторные и радиопротекторные свойства.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-00730-а и 14-44-03562-р_центр_а.

Список литературы

1. Гудков С.В., Иванов В.Е., Карп О.Э., Черников А.В., Белослудцев К.Н., Бобылёв А.Г., Асташев М.Е., Гапеев А.Б., Брусков В.И. Влияние биологически значимых анионов на образование активных форм кислорода в воде под действием неионизирующих физических факторов // Биофизика. 2014. Т. 59. № 5. С. 862-870.
2. Гудков С.В., Попова Н.Р., Брусков В.И. Радиозащитные вещества: история, тенденции и перспективы // Биофизика. 2015. Т. 60. № 4. С. 801-811.
3. Гудков С.В., Брусков В.И., Куликов А.В., Бобылёв А.Г., Куликов Д.А., Молочков А.В. Биоантиоксиданты (часть 1) // Альманах клинической медицины. 2014. № 31. С. 61-65.

4. Гудков С.В., Гудкова О.Ю., Штаркман И.Н., Гапеев А.Б., Чемерис Н.К., Брусков В.И. Гуанозин и инозин как природные генопротекторы для клеток крови мышей при воздействии рентгеновского излучения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2006. Т. 46. № 6. С. 713-718.
5. Заичкина С.И., Кондакова Н.В., Розанова О.М., Аптикаева Г.Ф., Ахмадиева А.Х., Сахарова В.В., Рипа Н.В., Колхир В.К., Сокольская Т.А., Ребров Л.Б., Быков В.А. Тестирование противолучевого действия биологически активных веществ в диапазоне средних и малых доз облучения с использованием цитогенетического показателя – микроядерного теста // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. № 8. С. 3-8.
6. Смирнова В.С., Гудков С.В., Черников А.В., Брусков В.И. Образование 8-оксогуанина и его окисленных продуктов в днк *in vitro* под действием температуры 37°С. // Биофизика. 2005. Т. 50. № 2. С. 243-252.
7. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино. 2013. 310 с.
8. Шаталин Ю.В. Комплексы флавоноидов с металлами переменной валентности. Пушино: Фотон-Век, 2010. 176 с.
9. Шелковская О.В., Иванов В.Е., Карп О.Э. Дигидрокверцетин уменьшает концентрацию перекиси водорода и гидроксильных радикалов, индуцированных рентгеновским излучением // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 3; URL: www.science-education.ru/123-18969 (дата обращения: 10.11.2015).
10. Asadullina N.R., Gudkov S.V., Bruskov V.I. Caffeine modifies effects of x-ray action on mice after exposure to radiation and exhibits radioprotective properties // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2012. Т. 442. № 1. С. 22-25.

Рецензенты:

Буданцев А.Ю., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пушино;

Гудков С.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, г. Пушино.