

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЛАВОНОИДОВ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПЛОДОВ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ

Куркин В.А.<sup>1</sup>, Авдеева Е.В.<sup>1</sup>, Правдивцева О.Е.<sup>1</sup>, Куркина А.В.<sup>1</sup>, Рыжов В.М.<sup>1</sup>, Росихин Д.В.<sup>1</sup>, Агапов А.И.<sup>1</sup>, Кулагин О.Л.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара, e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

В настоящей работе представлены результаты сравнительного исследования антиоксидантной активности некоторых флавоноидов (рутин, кверцетин, дигидрокверцетин, силибин) и гепатопротекторных лекарственных препаратов (силитар, карсил) на основе плодов расторопши пятнистой - *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Исследования антиоксидантной активности флавоноидов и фитопрепаратов проведены на модели токсического гепатита, вызванного интоксикацией четыреххлористым углеродом в ткани печени крыс. Определено, что влияние на уровень малонового диальдегида, как конечного продукта перекисного окисления липидов, среди индивидуальных веществ в наибольшей мере оказывает дигидрокверцетин. Далее антиоксидантная активность уменьшается в ряду: силибин, рутин, кверцетин. Исследованные фитопрепараты (силитар, карсил) по способности тормозить перекисное окисление липидов уступают индивидуальным флавоноидам, причем их активность сопоставима. Установлено, что активность супероксиддисмутазы увеличивается в наибольшей степени под влиянием кверцетина. Далее антиоксидантная активность уменьшается в ряду: дигидрокверцетин, силибин, рутин. Способность повышать активность супероксиддисмутазы, выявленная для карсила и силитара, сопоставима с таковой силибина – индивидуального флаволигнана плодов расторопши пятнистой. Изучено, что активность каталазы возрастает в наибольшей мере под влиянием кверцетина. Далее активность уменьшается в ряду: силибин, рутин, дигидрокверцетин, а активность карсила и силитара сопоставима с таковой индивидуальных веществ. Определено, что активность глутатионпероксидазы возрастает в наибольшей мере под влиянием кверцетина, далее активность уменьшается в ряду: дигидрокверцетин, силибин, рутин. При этом активность исследованных фитопрепаратов сопоставима с таковым эффектом силибина.

Ключевые слова: расторопша пятнистая, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., плоды, лекарственные растительные препараты, гепатопротекторы, флавоноиды, антиоксидантная активность.

## THE COMPARATIVE STUDY OF THE ANTIOXIDATIVE ACTIVITY OF THE SOME FLAVONOIDS AND HEPATOPROTECTIVE PHARMACEUTICALS ON THE BASIS OF *SILYBUM MARIANUM* FRUITS

Kurkin V.A.<sup>1</sup>, Avdeeva E.V.<sup>1</sup>, Pravdivtseva O.E.<sup>1</sup>, Kurkina A.V.<sup>1</sup>, Ryzhov V.M.<sup>1</sup>, Rosikhin D.V.<sup>1</sup>, Agapov A.I.<sup>1</sup>, Kulagin O.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Samara State Medical University, Samara, e-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

In the present paper the results of the comparative antioxidative activities of the some flavonoids (quercetin, rutin, dihydroquercetin and silybin) and phytopharmaceuticals (silymar, carsil) on the basis of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. fruits. The antioxidative activities of the flavonoids and phytopreparations on the model of toxic hepatitis, caused by perchloromethane (CCl<sub>4</sub>) in the tissue of the liver of rats there were studied. The influence on the level of malonyl dialdehyde, which is the final product of lipid peroxidation, is caused in the greatest degree by dihydroquercetin. Further the antioxidative activity of others compounds are reduced in the range of silybin, rutin, quercetin. The ability of the studied phytopharmaceuticals to reduce the lipid peroxidation is comparable with the activity of individual compounds. It was determined, that the activity of superoxidismutase increases in the greatest degree by the influence of quercetin. Further the activity decreases among: silybin, rutin, dihydroquercetin. The ability to increase the activity of superoxidismutase, shown for carsil and silymar is comparable to that of silybin – an individual flavolignan of *Silybum marianum* fruits. It was studied that the activity of catalase increases in the greatest degree under the influence of a quercetin. Further the activity decreases among: silybin, rutin, dihydroquercetin, and the activities of carsil and silymar is comparable to that of individual compounds. It was established that the activity of glutathione peroxidase increases in the greatest degree under the influence of quercetin, further the activity decreases among:

**dihydroquercetin, silybin, rutin. At the same time the activity of the researched phytomedicines is comparable to that effect of silybin.**

Keywords: *milk thistle, Silybum marianum* (L.) Gaertn., fruits, phytopreparations, hepatoprotectors, flavonoids, antioxidative activity.

В медицинской практике широко применяются лекарственные препараты на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС), содержащего флавоноиды, которые обуславливают широкий спектр биологической активности [3]. Особый интерес представляют антиоксидантные свойства флавоноидов, среди которых дигидрокверцетин (таксифолин), являющийся компонентом древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica* L.), используется в качестве лекарственной субстанции для производства препарата «Диквертин», а также целого ряда биологически активных добавок [3].

Близкими по строению к дигидрокверцетину (1) является кверцетин (2) и его 3-О-рутинозид (рутин) (3), широко встречающиеся в лекарственных растениях. Кроме того, дигидрокверцетин (1) является фрагментом в молекуле силибина (4) и других флаволигнанов плодов расторопши пятнистой [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.], служащих ценным источником гепатопротекторных лекарственных средств (силибинин, легалон, силимар, карсил и др.) [3]. Данное обстоятельство делает актуальным сравнительное изучение близких по строению флавоноидов, а также лекарственных препаратов на их основе.

Цель настоящих исследований - сравнительное исследование антиоксидантной активности некоторых флавоноидов и лекарственных препаратов на основе плодов расторопши пятнистой.

#### **Материал и методы исследования**

Исследования антиоксидантной активности флавоноидов и лекарственных препаратов на основе плодов расторопши пятнистой (силимар, карсил) проведены на модели токсического гепатита, вызванного интоксикацией четыреххлористым углеродом в ткани печени крыс [5]. При этом было применено многократное введение четыреххлористого углерода крысам в дозе 2,0 г/кг веса животного. 50%-ный масляный раствор четыреххлористого углерода вводился крысам внутримышечно ежедневно в течение шести дней.

Исследование осуществляли на белых половозрелых лабораторных крысах обоего пола массой тела 200-260 граммов. Крысы находились на обычном рационе вивария и были вовлечены в эксперимент одновременно, что исключает влияние внешних температурных, климатических и иных факторов на разницу активности ферментов у опытных и контрольных групп животных. Во время эксперимента доступ крыс к воде и корму был свободным.

Флавоноиды и фитопрепараты вводились опытным крысам внутривенно через зонд ежедневно в течение 6 дней параллельно с введением четыреххлористого углерода: силимар и карсил вводились в дозе 50 мг/кг массы тела, а индивидуальные вещества – дигидрокверцетин (1), кверцетин (2), рутин (3) и силибин (4) (рис. 1) в дозе 25 мг/кг.

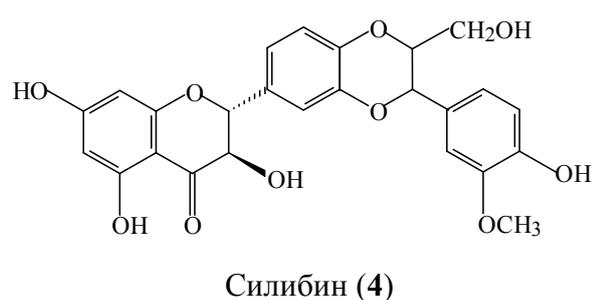
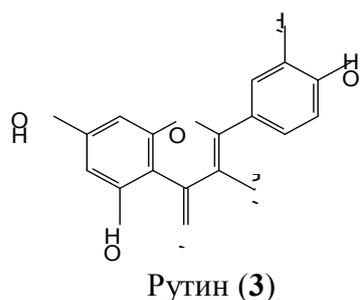
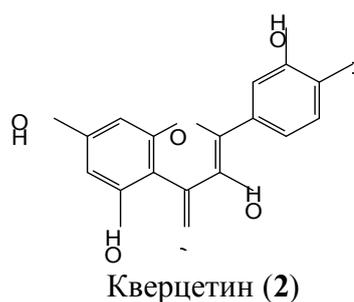
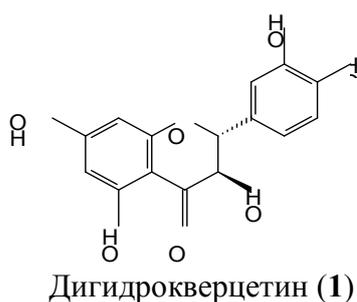
Контрольной группе крыс 50%-ный масляный раствор четыреххлористого углерода вводился ежедневно в течение 6 дней. Была задействована интактная группа крыс, а также группа крыс, получавшая наряду с четыреххлористым углеродом 40%-ный спирт в дозе 0,2 мл/кг, в 10 раз разбавленный водой. На седьмой день крыс забивали, у них удаляли печень. Крысы забивались в соответствии с этическими нормами под эфирным наркозом методом декапитации. Печень крыс была значительно увеличена в объеме и макроскопически изменена, ткань печени на разрезе приобретала серый оттенок. После извлечения печень промывалась физиологическим раствором и сразу замораживалась в сосуде с твердой углекислотой («сухим льдом») при температуре  $-70 \dots -80$  °C. Затем из ткани печени готовился гомогенат для проведения анализа на содержание малонового диальдегида (МДА), а также определения активности супероксиддисмутазы (СОД), глутатионпероксидазы (ГП) и каталазы. Гомогенат готовился механическим измельчением ткани печени массой 1 грамм с 5 мл фосфатного буфера (рН 7,4) со скоростью 5000 об/мин в сосуде с двойными стенками, постоянно охлаждаемом проточной водой.

Все данные активности ферментов и уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) рассчитывались на содержание белка. Определение белка в печеночной ткани производилось микробиуретовым методом [7]. Определение конечного продукта перекисного окисления липидов осуществляли на основе принципа [6], в соответствии с которым при высокой температуре в кислой среде МДА реагирует с тиобарбитуровой кислотой, образуя окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при длине волны 532 нм. Определение активности каталазы основано на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс [2]. В гомогенате печени определяли также активность супероксиддисмутазы (СОД) - фермента, инактивирующего супероксидные радикалы и уменьшающего интенсивность перекисного окисления липидов. Супероксиддисмутаза относится к числу ферментов, входящих в состав антиоксидантной защитной системы организма. Активность СОД определяли по методу, описанному в литературе [1]. Определение активности глутатионпероксидазы осуществляли в соответствии с известной методикой [4].

Дигидрокверцетин (1), рутин (3) и силибин (4) выделены в индивидуальном виде с использованием колоночной хроматографии (силикагель L 40/100) соответственно из древесины лиственницы сибирской, травы гречихи посевной и плодов расторопши

пятнистой. Кверцетин (2) получен в ходе кислотного гидролиза рутина (3) с последующей перекристаллизацией из водного спирта. Химическое строение выделенных веществ устанавливали с использованием УФ-, ЯМР-спектроскопии, а также сравнением физико-химических констант и хроматографической подвижности (ТСХ-анализ) с достоверно известными образцами веществ.

Кроме того, для доказательства химического строения флавоноидов использованы современные методы исследования: УФ-, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия.



### Результаты исследования и их обсуждение

В результате исследований было установлено, что при интоксикации четыреххлористым углеродом в дозе 2,0 г/кг в печени повышается интенсивность перекисного окисления липидов, что проявляется в увеличении содержания малонового диальдегида в гомогенате (табл. 1). Из таблицы 1 видно, что при интоксикации четыреххлористым углеродом в дозе 2,0 г/кг при параллельном введении спирта в дозе 0,2 мл/кг в печени повышается интенсивность перекисного окисления липидов и снижается противоперекисная защита, понижается активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы. Показано, что спирт не влияет в значительной мере на токсическое действие четыреххлористого углерода, так как не нормализует перекисное окисление липидов печени крыс и активность ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы гепатоцитов (табл. 1-4). Поэтому применение его в качестве

растворителя не изменяет картину антиоксидантного, гепатопротекторного действия фитопрепаратов.

Определено, что влияние на уровень МДА, как конечного продукта ПОЛ, среди индивидуальных веществ в наибольшей мере оказывает дигидрокверцетин (снижается на 34,5% по сравнению с контрольной группой). Далее антиоксидантная активность уменьшается в ряду: силибин, рутин, кверцетин. Исследованные фитопрепараты по способности тормозить ПОЛ уступают индивидуальным флавоноидам, причем их активность сопоставима (табл. 1).

Установлено, что активность СОД увеличивается в наибольшей степени под влиянием кверцетина (увеличение на 70,3%). Далее антиоксидантная активность уменьшается в ряду: дигидрокверцетин, силибин, рутин. Интересно отметить, что способность активности СОД, выявленная для карсила и силимара, сопоставима с таковой силибина – индивидуального флаволигнана расторопши пятнистой (табл. 2).

Изучено, что активность каталазы возрастает в наибольшей мере под влиянием кверцетина (увеличивается на 26,3%) (табл. 3). Далее активность уменьшается в ряду: силибин, рутин, дигидрокверцетин (табл. 3). Что касается препаратов (карсил и силимар), то их активность сопоставима с таковой индивидуальных веществ (табл. 3).

Определено, что активность ГП возрастает в наибольшей мере под влиянием кверцетина (возрастает на 35,3%); далее активность уменьшается в ряду: дигидрокверцетин, силибин, рутин (табл. 4). При этом важно подчеркнуть, что активность исследованных фитопрепаратов сопоставима с таковой по способности силибина – индивидуального флаволигнана расторопши пятнистой (табл. 4).

Таблица 1

Влияние фитопрепаратов на уровень малонового диальдегида

Фитопрепараты	Малоновый диальдегид, нмоль/мг белка печени (опыт)	Малоновый диальдегид, нмоль/мг белка печени (контроль)	Степень уменьшения уровня МДА, %
Интактные (в сравнении с ССl <sub>4</sub> )	13,33 ± 3,73 p<0,01	26,29 ± 3,09	
Интактные (в сравнении с ССl <sub>4</sub> +спирт)	15,37 ± 2,85 p<0,01	28,06 ± 4,44	
ССl <sub>4</sub> + карсил	22,25 ± 2,39 p<0,01	26,29 ± 3,09	15,7
ССl <sub>4</sub> + силимар	22,10 ± 3,52 p<0,05	26,75 ± 4,02	17,4
ССl <sub>4</sub> + дигидрокверцетин	17,21 ± 2,20 p<0,01	26,29 ± 3,09	34,5
ССl <sub>4</sub> + кверцетин	21,21 ± 2,12 p<0,01	28,02 ± 3,50	24,3

CCl <sub>4</sub> + силибин	20,93 ± 3,74 p<0,01	28,02 ± 3,50	25,5
CCl <sub>4</sub> + рутин	21,07 ± 1,48 p<0,01	28,02 ± 3,50	24,8

Таблица 2

Влияние фитопрепаратов на активность супероксиддисмутазы

Фитопрепараты	Супероксиддисмутаза, АЕД/мг белка печени (опыт)	Супероксиддисмутаза, АЕД/мг белка печени (контроль)	Степень повышения активности фермента, %
Интактные (в сравнении с CCl <sub>4</sub> )	1,20 ± 0,45 p<0,05	0,72 ± 0,31	
Интактные (в сравнении с CCl <sub>4</sub> +спирт)	1,90 ± 0,18 p<0,05	1,47 ± 0,46	
CCl <sub>4</sub> + карсил	1,02 ± 0,34 p<0,01	0,72 ± 0,31	41,7
CCl <sub>4</sub> + силимар	1,69 ± 0,29 p<0,05	1,24 ± 0,31	36,2
CCl <sub>4</sub> + дигидрокверцетин	1,07 ± 0,29 p>0,05	0,72 ± 0,31	48,6
CCl <sub>4</sub> + кверцетин	2,18 ± 0,33 p<0,01	1,28 ± 0,55	70,3
CCl <sub>4</sub> + силибин	1,89 ± 0,45 p<0,05	1,28 ± 0,55	47,7
CCl <sub>4</sub> + рутин	1,47 ± 0,11 p>0,05	1,28 ± 0,55	30,5

Таблица 3

Влияние фитопрепаратов на активность каталазы

Фитопрепараты	Каталаза, нМоль/с H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мг белка печени (опыт)	Каталаза, нМоль/с H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /мг белка печени (контроль)	Степень повышения активности фермента, %
Интактные (в сравнении с CCl <sub>4</sub> )	0,0737 ± 0,0101 p<0,05	0,0566 ± 0,0135	
Интактные (в сравнении с CCl <sub>4</sub> +спирт)	0,1070 ± 0,0226 p<0,05	0,0858 ± 0,0101	
CCl <sub>4</sub> + карсил	0,0670 ± 0,0219 p>0,05	0,0566 ± 0,0135	18,4
CCl <sub>4</sub> + силимар	0,1009 ± 0,0269 p>0,05	0,0839 ± 0,0125	20,1
CCl <sub>4</sub> + дигидрокверцетин	0,0663 ± 0,0079 p>0,05	0,0566 ± 0,0135	17,7
CCl <sub>4</sub> + кверцетин	0,1060 ± 0,0218 p<0,05	0,0839 ± 0,0125	26,3
CCl <sub>4</sub> + силибин	0,1050 ± 0,0256 p>0,05	0,0839 ± 0,0125	25,1
CCl <sub>4</sub> + рутин	0,1045 ± 0,0198 p<0,05	0,0839 ± 0,0125	24,6

Таблица 4

### Влияние фитопрепаратов на активность глутатионпероксидазы

Фитопрепараты	Глутатионпероксидаза, мкМоль/мин/мг белка печени (опыт)	Глутатионпероксидаза, мкМоль/мин/мг белка печени (контроль)	Степень повышения активности фермента, %
Интактные (в сравнении с CCl <sub>4</sub> )	1,87 ± 0,66 p<0,05	1,12 ± 0,25	
Интактные (в сравнении с CCl <sub>4</sub> +спирт)	1,98 ± 0,30 p<0,05	1,55 ± 0,31	
CCl <sub>4</sub> + карсил	1,41 ± 0,49 p>0,05	1,12 ± 0,25	25,9
CCl <sub>4</sub> + силимар	1,17 ± 0,33 p>0,05	0,96 ± 0,34	21,9
CCl <sub>4</sub> + дигидрокверцетин	1,45 ± 0,45 p>0,05	1,12 ± 0,25	29,5
CCl <sub>4</sub> + кверцетин	2,03 ± 0,22 p<0,01	1,50 ± 0,33	35,3
CCl <sub>4</sub> + силибин	1,93 ± 0,22 p<0,05	1,50 ± 0,33	28,7
CCl <sub>4</sub> + рутин	1,70 ± 0,27 p>0,05	1,50 ± 0,33	13,3

Таким образом, исследованные флавоноиды и фитопрепараты на основе флавоноидов обладают выраженным влиянием на ферментативные и неферментативные звенья антиоксидантной защиты при токсическом поражении печени и могут использоваться в патогенетической терапии патологических состояний, связанных с нарушением эндогенной антиоксидантной защиты. Примечательно, что силибин (флаволигнан плодов расторопши пятнистой) и лекарственные препараты (силимар, карсил) на основе сырья данного растения обладают сопоставимой антиоксидантной активностью на всех моделях.

#### **Выводы**

Определено, что флавоноиды (дигидрокверцетин, кверцетин, силибин, рутин) и фитопрепараты на основе флавоноидов (силимар, карсил) характеризуются комплексным действием на неферментативные и ферментативные звенья антиоксидантной защиты и могут быть рекомендованы для назначений при различных сдвигах в системе «прооксидант – антиоксидант» при поражениях печени токсической природы. Принимая во внимание то обстоятельство, что антиоксидантная активность зависит от химического строения исследованных флавоноидов, представляется актуальным создание комбинированных гепатопротекторных лекарственных средств, в которых могут реализовываться различные механизмы действия.

#### **Список литературы**

1. Гуревич В.С., Конторщикова К.Н., Шатилина Л.В. Сравнительный анализ двух

- методов определения активности супероксиддисмутаза // Лаб. дело. - 1990. - № 4. - С. 44-47.
2. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Т. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. - 1988. - № 1. - С. 16-19.
  3. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). - 3-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт»; ФБГОУ ВО «СамГМУ» Минздрава России, 2016. - 1279 с.
  4. Моин В.М. Простой и специфический метод определения глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. - 1986. - № 12. - С. 724-726.
  5. Саратиков А.С., Венгеровский А.И. Эффективность гепатозащитных средств при экспериментальном хроническом гепатите // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 1996. - № 1. - С. 59-60.
  6. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Современные методы в биохимии. - М., 1977. - С. 66-68.
  7. Itzhaki R.F., Gill D.M. A micro-biuret method for estimating proteins // Analytical Biochemistry. - 1964. – Vol. 9, No. 4. - P. 401-410.