УДК 616–003.725

А.Н. Гребенюк[1], В.А. Башарин[1], Р.А. Тарумов[1],
А.В. Арутюнян[2], В.М. Прокопенко[2], В.Ю. Ковтун[3]

Оценка антиоксидантных свойств отечественного синтетического генистеина на моделях in vitro и in vivo

[1]Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург
[2]Научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург
[3]Научно-производственный центр «Фармзащита», Химки, Московская область

***Резюме**. В опытах in vitro проведено сравнительное изучение антиоксидантных свойств отечественного генистеина с аскорбиновой кислотой и кверцетином, in vivo – оценка влияния генистеина на динамику содержания восстановленного глутатиона, малонового диальдегида, активности глутатион-редуктазы, глутатион-трансферазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах белых беспородных крыс в течение 72 ч после введения препарата. При проведении хемилюминесцентной реакции рибофлавина в присутствии ионов двухвалентного железа и перекиси водорода установлено, что генистеин и аскорбиновая кислота in vitro обладают схожей антиоксидантной активностью, но наибольшей антиоксидантной активностью обладает кверцетин. В опытах на крысах показано, что через 4 ч и 24 ч после введения генистеина в эритроцитах периферической крови животных отмечалось значимое увеличение количества восстановленного глутатиона по сравнению с контролем на 73,8 и 85% соответственно. Выявлено индуцирующее влияние генистеина на активность ферментов системы глутатиона и ингибирование перекисного окисления липидов. Через 1 ч после введения генистеина в 1,34 раза по сравнению с контролем снижался уровень малонового диальдегида, а через 4 ч в 1,58 раза повышалась активность глутатион-редуктазы. Через 24 ч – в 1,16 раза увеличивалась активность глутатион-трансферазы. Через 72 ч активность всех исследуемых ферментов возвращалась к исходному уровню. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы не изменялась в течение всего срока наблюдения. Обсуждаются возможные механизмы проявления антиоксидантной активности генистеина, связанные со способностью реагировать со свободорадикальными соединениями, а также оказывать влияние на сигнальные процессы, протекающие в живых системах, за счет специфического взаимодействия с белками, выполняющими регуляторные функции.*

***Ключевые слова**: антиоксидант, генистеин, аскорбиновая кислота, кверцетин, хемилюминесценция, система глутатиона, крысы.*

Введение. Флавоноиды – обширный класс низкомолекулярных многоатомных фенолов растительного происхождения. Исследование их строения, физико-химических свойств и биологической активности по отношению к организму были начаты еще в 30-х годах прошлого столетия [9]. Однако интерес к проблеме флавоноидов не ослабевает до сих пор. Накопленные знания свидетельствуют о том, что флавоноиды способны оказывать влияние на ход самых разнообразных физиологических процессов по различным механизмам [2]. Считается, что в основе биологического действия фенольных соединений лежат их антиоксидантные свойства, заключающиеся в способности реагировать со свободорадикальными соединениями, образующимися в условиях окислительного стресса [16, 20], а также их способностью оказывать влияние на сигнальные процессы, протекающие в живых системах, за счет специфического взаимодействия с белками, выполняющими регуляторные функции [17].

Одним из представителей этой группы является генистеин. Зарубежными исследователями установлено, что генистеин, наряду с малой токсичностью [14], является эффективным скавенджером реактивных метаболитов кислорода и азота [11, 13]. Кроме того, обнаружено, что генистеин не оказывает влияния на активность печеночных ферментов антиоксидантной защиты – каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы [19]. При этом активность никотинамиддинуклеотидфосфатхиноноксидоредуктазы на фоне введения генистеина крысам увеличивается в 2 раза по сравнению с контролем [15], а сведения о влиянии препарата на содержание восстановленного глутатиона в клетках довольно противоречивы [18, 19].

В Научно-производственном центре (НПЦ) «Фармзащита» Федерального медико-биологического агентства (ФМБА) (г. Химки, Московская область) был синтезирован 4,5,7-тригидроксиизофлавоноид (генистеин), производство которого на порядок дешевле иностранного аналога. В ранее проведенных нами исследованиях [4] установлено, что отечественный синтетический генистеин, как и его зарубежный аналог из растительного сырья, является малотоксичным соединением. Однако сведения о влиянии генистеина на антиоксидантную систему организма наравне с данными о способности препарата модулировать процессы свободно-радикального окисления в мо-

дельных системах *in vitro* в доступной литературе не представлены.

Цель исследования. Сравнить антирадикальную активность генистеина, кверцетина и аскорбиновой кислоты на модели *in vitro,* а также изучить состояние обмена глутатиона и перекисного окисления липидов в эритроцитах белых крыс в течение 3 сут после введения генистеина.

Материалы и методы. Оценку антиоксидантных свойств генистеина, синтезированного в НПЦ «Фармзмщита» ФМБА России, проводили в два этапа.

На первом этапе, для сравнительной оценки антиоксидантной активности (АОА) генистеина, аскорбиновой кислоты и кверцетина, на модели *in vitro* использовали хемилюминесцентную реакцию рибофлавина в присутствии ионов двухвалентного железа и перекиси водорода [8].

В измерительную кювету биохемилюминометра «БХЛ-06М» (Нижний Новгород, Россия) для создания модельной системы вносили 710 мкл калий-фосфатного буфера pH 9,0; 40 мкл 10 мМ рибофлавина; 100 мкл дистиллированной воды или 50% диметилсульфоксида; 50 мкл 25мМ $FeSO_4$ x $7H_2O$. Инициировали процесс окисления введением 100 мкл 0,1% раствора перекиси водорода. В опытную систему вместо 100 мкл дистиллированной воды или диметилсульфоксида вносили 100 мкл генистеина, который растворяли в 20 мкл диметилсульфоксида и доводили водой до исходной концентрации 1000 мкг/мл. Затем готовили ряд серийный разведений препарата в концентрациях от 0,78 до 100 мкг/мл. Измерение светосуммы осуществляли в течение 60 с при комнатной температуре. Величину АОА рассчитывали как отношение светосумм опытной и модельной систем в процентах.

В качестве препаратов сравнения использовали кверцетин и аскорбиновую кислоту («Sigma», Соединенные Штаты Америки). Графически определяли концентрацию соединения, которая уменьшала интенсивность хемилюминесценции модели на 50% [8].

Исследования, направленные на изучение антиоксидантных свойств генистеина *in vivo* выполнены на 54 белых беспородных крысах-самцах массой 160–220 г из питомника Российской академии медицинских наук Рапполово. Животные содержались в виварии и получали стандартный пищевой рацион. При проведении исследования выполняли требования нормативно-правовых актов о порядке экспериментальной работы с использованием животных, в том числе по гуманному отношению к ним [5].

Используемый в эксперименте синтетический препарат – генистеин, синтезированный в НПЦ «Фармзащита» ФМБА России, представлял собой кристаллический порошок светло-желтого цвета. Перед введением генистеин предварительно растворяли в 50% растворе диметилсульфоксида при нагревании и одновременном размешивании. Растворы генистеина готовили непосредственно перед их введением крысам. Препарат в дозе 200 мг/кг вводили внутрибрюшинно. Объем вводимого животным раствора генистеина составлял 0,4 мл на 100 г массы тела животного. Особям контрольной группы тем же способом и в том же объеме вводили растворитель.

Исследования показателей системы глутатиона и перекисного окисления липидов (ПОЛ) проводили через 1, 4, 24 и 72 ч после введения препарата. Кровь для исследований забирали у животных после декапитации, стабилизировали 4% раствором цитрата натрия, охлаждали и немедленно использовали в исследованиях. Эритроциты выделяли центрифугированием, затем гемолизировали 5 мМ ТРИС-HCl буфером с pH 7,6 в соотношении 1:9. Полученный гемолизат использовали для определения перечисленных ниже биохимических показателей.

Концентрацию восстановленного глутатиона (ВГ), малонового диальдегида (МДА), активность глутатион-редуктазы (ГР), глутатион-S-трансферазы (ГТ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) в гемолизате эритроцитов оценивали с использованием общепринятых методик [1]. Расчет активности ферментов производили на 1 г гемоглобина. Концентрацию гемоглобина определяли с помощью стандартных наборов «Ольвекс» (Россия) гемиглобинцианидным методом и выражали в г/л.

Статистическую обработку полученных результатов проводили на персональном компьютере с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6,0». В каждой группе рассчитывали средние значения и ошибку среднего. Достоверность различий с соответствующей контрольной группой оценивали по t-критерию Стьюдента. Различия между показателями считали достоверными при значении $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что среднеэффективная доза для кверцетина *in vitro* оказалась равной 3,9 мкг/мл. Для отечественного генистеина и аскорбиновой кислоты величина этого показателя составила 12,5 и 9,4 мкг/мл соответственно (рис. 1).

Считается, что чем ниже среднеэффективная доза соединения, тем его АОА по отношению к модельной системе будет выше [3]. Выявлено, что по способности ингибировать образование активных радикалов лидирующее место занимает кверцетин. Между тем значения среднеэффективной дозы аскорбиновой кислоты и генистеина практически соотносятся между собой. Полагаем, что антирадикальные свойства этих соединений в данных условиях сопоставимы. Аналогичные данные были получены ранее для генистеина, выделенного из соевых культур [7].

Влияние генистеина на динамику содержания ВГ, МДА, активности ГР, ГТ, Г-6-ФДГ в эритроцитах белых беспородных крыс в течение 72 ч после введения препарата представлено в таблице 1.

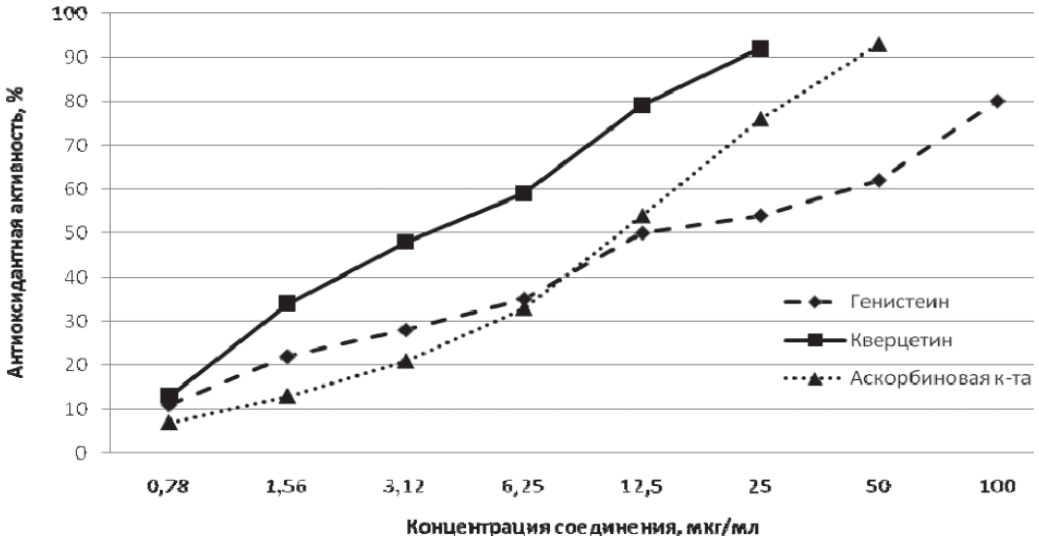

Рис. 1. Зависимость антиоксидантной активности генистеина, кверцетина и аскорбиновой кислоты от их концентраций

Показано, что в эритроцитах периферической крови крыс через 4 ч после введения животным генистеина концентрации ВГ повышалась на 73,8% ($p<0,05$), а спустя 1 сут значение этого показателя превосходило контрольные величины уже на 85% ($p<0,05$).

Выявлено индуцирующее влияние генистеина на активность ферментов системы глутатиона, таких как ГР и ГТ. Так, через 4 ч после введения генистеина отмечалась тенденция к увеличению активности ГР в 1,58 раза, а через 24 ч было зафиксировано двукратное ее увеличение по сравнению с контролем ($p<0,05$). Отмечено также, что введение генистеина характеризовалось достоверным повышением активности ГТ через 24 ч в 1,16 раза по сравнению с контрольным уровнем. В то же время активность Г-6-ФДГ значимо не отличалась от контроля за весь период наблюдения.

Через 1 ч после введения генистеина в 1,34 раза по сравнению с контролем снижался уровень МДА. В экспериментальных группах введение генистеина не вызывало увеличения концентрации МДА. К третьим суткам наблюдения показатели активности ферментов обмена глутатиона и процессов ПОЛ значимо не отличались от контрольных величин.

Таким образом, достоверно подтверждено наличие антиоксидантных свойств у отечественного синтетического генистеина.

В основе возможного механизма антиоксидантного действия генистеина могут лежать его структурно-функциональные особенности. Известно, что генистеин ввиду своей полифенольной структуры принадлежит к флавоноидам, которые давно рассматриваются как важнейшие антиокислители [2]. Их определяющим хими-

Таблица 1

Влияние генистеина на состояние системы глутатиона в эритроцитах белых беспородных крыс, $X \pm m_x$

Время после введения,ч	Группа	ВГ, мкмоль/г Hb	ГР, ммоль/г Hb·мин	ГТ, ммоль/г Hb·мин	Г-6-ФДГ, ммоль/г Hb·мин	МДА, мкмоль/г Hb
–	Интактные животные	3,3±0,08	21,3±1,83	0,92±0,04	168,08±9,4	0,61±0,08
1	Контроль	3,2±0,24	24,6±2,84	1,12±0,03	197,4±22,0	0,85±0,02
	Генистеин	3,32±0,27	22,85±2,5	0,94±0,02	178,71±8,2	0,63±0,04*
4	Контроль	1,92±0,09	22,44±2,02	0,63±0,03	185,2±17,3	0,93±0,08
	Генистеин	2,6±0,1*	35,6±6,5#	0,59±0,03	160,9±8,4	0,89±0,02
24	Контроль	3,82±0,1	16,09±2,2	1,2±0,03	223,8±12,9	0,63±0,03
	Генистеин	4,47±0,33*#	32,25±2,2*#	1,4±0,1*#	211,9±19,5#	0,66±0,04
72	Контроль	3,8±0,14	20,4±3,3	1,2±0,04	197,5±8,15	0,73±0,03
	Генистеин	3,5±0,24	25,3±4,1	1,04±0,03#	178,9±6,13	0,75±0,13

Примечание: * – различие с контрольной группой; # – с интактной группой, $p<0,05$; во всех группах количество животных равно 6.

ческим свойством, очевидно, является склонность легко отдавать протоны, входящие в состав гидроксильных групп в пара- и, особенно, в ортоположении кольца В. Окисляясь, полифенольные соединения в силу сопряженности окислительно-восстановительных реакций способствуют восстановлению других биологически активных веществ, либо препятствуют их окислению [16].

При патологических состояниях, обусловленных активацией процессов свободно-радикального окисления, антиоксидантные свойства генистеина, вероятнее всего, реализуются путем его восстановления в семихинонную форму [17]. В свою очередь, семихинон, по сути, тоже является радикалом, однако обладает сравнительно невысокой энергией окисления. В присутствии семихинона интенсивность окисления падает, число активных продуктов нарастает медленно или остается на прежнем уровне, а весь процесс окисления резко замедляется. В дальнейшем семихинонные радикалы диспропорционируют с образованием восстановленной молекулы генистеина. Показано также, что в условиях *in vitro* генистеин способен потенцировать АОА других антиоксидантов, в том числе восстановленного глутатиона и аскорбата [7].

Известно, что подавляющее большинство антиоксидантов, способных индуцировать активность антиоксидант-респонсивного элемента, т.е. опосредованно регулировать экспрессию ферментов антиоксидантной защиты, имеют полифенольную структуру [6]. По-видимому, это обстоятельство может быть объяснением повышения активности основных ферментов системы глутатиона спустя 24 ч после введения синтетического генистеина. В свою очередь, увеличение содержания ВГ в эритроцитах к этому сроку является следствием активации ГР.

Вместе с тем, антиоксидантные свойства, присущие генистеину, могут быть основаны на его структурной схожести с β-эстрадиолом. Так, C. Borras et al. [10] не исключают возможности прямой активации эстрогеновых рецепторов ERβ природным аналогом синтетического генистеина, что приводит к проявлению специфической активации киназы ERK1/2 и транскрипционного фактора NFkB с последующей экспрессией марганцевой супероксиддисмутазы в культуре клеток линии MCF-7. Выявлено влияние генистеина и на активацию фактора роста TGFb1, ответственного за модификацию экспрессии индуцибельной NO-синтазы, которая, как известно, приводит к увеличению выработки активного радикала $NO^{\bullet}$ [12].

Таким образом, отечественный синтетический генистеин, являясь антиоксидантом, способен ингибировать свободно-радикалное окисление в модельных системах *in vitro* и *in vivo* по различным механизмам.

Выводы

Отечественный синтетический генистеин и аскорбиновая кислота проявляют сопоставимые антиоксидантные свойства в модельной системе *in vitro*.

Генистеин способен активировать антиоксидантные ферменты и ингибировать процессы перекисного окисления липидов в эритроцитах белых крыс.

Литература

1. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. – СПб.: Фолиант, 2000. – 104 с.
2. Барабой, В.А. Изофлавоноиды сои: биологическая активность и применение / В.А. Барабой // Биотехнология. – 2009. – Т. 2, № 3. – С. 44–54.
3. Бурлакова, Е.Б. Антиоксиданты. Термины и определения / Е.Б. Бурлакова, В.М. Мисин, Н.Г. Храпова – М.: Изд-во РУДН, 2010. – 63 с.
4. Гребенюк, А.Н. Экспериментальное исследование острой токсичности генистеина в опытах на мелких лабораторных животных / А.Н. Гребенюк [и др.] // Токсикологический вестник. – 2012. – Т. 117, № 6. – С. 25–29.
5. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – СПб.: Rus-LASA «НП объединение специалистов по работе с лабораторными животными», рабочая группа по переводам и изданию тематической литературы, 2012. – 48 с.
6. Ляхович, В.В. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент / В.В. Ляхович [и др.] // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 9. – С. 1183–1197.
7. Макарова, М.Н. Антиоксидантная активность флавоноидов и их олигокомпонентных комбинаций и полифенолсодержащих препаратов в эксперименте: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / М.Н. Макарова. – М., 2003. – 22 с.
8. Путилина, Ф.Е. Практикум по свободнорадикальному окислению: учебно-метод. пособие / Ф.Е. Путилина [и др.] – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2006. – С. 82–83.
9. Benthsath, A. Vitamin nature of flavones / A. Benthsath [et al.] // Nature. – 1936. – Vol. 138. – P. 798.
10. Borrás, C. Genistein, a soy isoflavone, up-regulates expression of antioxidant genes: involvement of estrogen receptors, ERK1/2, and NFκB / C. Borrás [et al.] // FASEB J. – 2006. – Vol. 20, № 12. – P. 2136–2138.
11. Guo, Q. ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids / Q. Guo [et al.] // Toxicology. – 2002. – Vol. 179, № 1–2. – P. 171–180.
12. Kim, H. Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor b signaling pathways / H. Kim [et al.] // Am. j. clin. nutr. – 1998. – Vol. 68. – P. 1418–1425.
13. Kruk, I. Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein / I. Kruk [et al.] // Luminescence. – 2005. – Vol. 20, № 2. – P. 81–89.
14. McClain, M.R. Genetic toxicity studies with genistein / M.R. McClain [et al.] // Food chem. toxicol. – 2006. – Vol. 44, № 1 – P. 42–55.
15. Ross, D. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1, DT diaphorase), functions and pharmacogenetics / D. Ross [et al.] // Methods enzymol. – 2004. – Vol. 382. – P. 115–144.
16. Soobrattee, M.A. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions / M.A. Soobrattee [et al.] // Mutat. res. – 2005. – Vol. 579, № 1/2. – P. 200–213.
17. Stevenson, D.E. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? / D.E. Stevenson [et al.] // Cell. mol. life sci. – 2007. – Vol. 64, № 22. – P. 2900–2916.

18. Vanhees, K. Intrauterine exposure to flavonoids modifies antioxidant status at adulthood and decreases oxidative stress-induced DNA damage / K. Vanhees [et al.] // Free radical biol. med. – 2013. – Vol. 57. – P. 154–161.

19. Wiegand, H. Effect of dietary genistein on phase II and antioxidant enzymes in rat liver / H. Wiegand [et al.] // Cancer genomics proteomics. – 2009. – № 6. – P. 85–92.

20. Willcox, J.K. Antioxidants and prevention of chronic disease / J.K. Willcox [et al.] // Crit. rev. food sci. nutr. – 2004. – Vol. 44, № 4. – P. 275–295.

A.N. Grebenyuk, V.A. Basharin, R.A. Tarumov, A.V. Arutyunyan, V.M. Prokopenko, V.Yu. Kovtun

Estimation of antioxidant properties of domestic synthetic genistein in the models in vitro and in vivo

Abstract. In vitro comparative study antioxidant domestic genistein with ascorbic acid and quercetin, in vivo - evaluation of the influence on the dynamics of genistein content of reduced glutathione, malondialdehyde, activity of glutathione reductase, glutathione transferase, glucose-6-phosphate dehydrogenase in erythrocytes albino rats within 72 hours after drug administration. During the chemiluminescent reaction of riboflavin in the presence of ferrous ion and hydrogen peroxide found that genistein and ascorbic acid in vitro have similar antioxidant activity, but has the highest antioxidant activity of quercetin. In experiments on rats showed that after 4 and 24 h after administration of genistein in erythrocytes of the peripheral blood of animals there was a significant increase in glutathione compared with the control to 73,8 and 85% respectively. We revealed inducing effect of genistein on the activity of enzymes of glutathione and inhibition of lipid peroxidation. 1 h after administration of genistein 1,34 times compared with the control level of malondialdehyde declined, and after 4 h increased by 1,58 times the activity of glutathione reductase. After 24 h – 1,16 times increased activity of glutathione transferase. After 72 hours, the activity of all enzymes studied returned to baseline. The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase did not change during the entire period of observation. Possible mechanisms of antioxidant activity of genistein manifestations associated with the ability to react with svobodoradikalnymi connections and also have an impact on the signaling processes in living systems, through a specific interaction with proteins that perform regulatory functions.

Key word: antioxidant, genistein, ascorbic acid, quercetin, chemiluminescence, glutathione system, rats.

Контактный телефон: 8 (812) 329-71-60; e-mail: tarumov_ra@mail.ru