

## Антиоксидантное действие адаптогенов витажена и антиокса и их влияние на физико-химические свойства и активность металлопротеинов крови *in vitro* и после повышенной физической нагрузки крыс *in vivo*

Н.А.Багдасарян, Р.Г.Бороян, М.А.Симонян

ЕрГМУ им. М.Гераци, Институт биохимии НАН РА

375025, Ереван, ул.Корюна, 2

**Ключевые слова:** адаптоген, витажен, антиокс, металлопротеины, физическая нагрузка

Препараты антиоксидантного действия растительного происхождения широко применяются в клинике как факторы, регулирующие уровень глюкозы и мочевины (экстракт *Seutellaria bascalensis* [2]) и стимулирующие адаптационные защитные системы организма после физической нагрузки (экстракт *Leuzea cathartnoids fluidem* [8]). Они способствуют восстановлению работоспособности и нормализации сна, оказывают кардиопротективный эффект при эмоционально-болевым стрессе, повышая уровень цАМФ и уменьшая содержание ГМФ (*Radiolae Levsea* [7]); обладают антивирусным действием, обусловленным стимулированием иницирования интерферона (*Saragola* [9]); оказывают положительное действие на организм после физической нагрузки и алкогольной интоксикации, регулируя эндогенный уровень некоторых металлопротеинов крови (препарат *Vitajen* [2, 3, 6]). Витажен и антиокс оказывают антистрессорное воздействие при повышенной физической нагрузке [4].

Целью работы является определение молекулярных механизмов воздействия витажена и антиокса на физико-химические свойства и активность ключевых металлопротеинов крови – регуляторов метаболизма активных форм кислорода (АФК), а также на супероксидпродуцирующую активность цитохрома  $b_{558}III$  мембран эритроцитов *in vitro* и после повышенной физической нагрузки *in vivo*.

### Материал и методы

Белые беспородные крысы массой 180–220 г были разделены на четыре группы по 12 в каждой. В контрольную группу вошли интактные животные. В первую опытную группу (ОГ-1) вошли крысы, подвергшиеся физической нагрузке (20-минутное плавание); в

ОГ-2 вошли животные, получавшие в течение 10 дней витажен в суточной дозе 60 мг/кг массы животного, затем подвергшиеся физической нагрузке; в ОГ-3 вошли животные, которые принимали антиокс (60 мг/кг массы животного) в течение 10 дней, а затем подвергались физической нагрузке. Животные содержались в аналогичных условиях и декапитировались под легким эфирным наркозом. Из крови животных всех групп был получен и очищен эритроцитарный мембранный цитохром  $b_{558}III$  по биотехнологическому способу путем ионообменной хроматографии фракции мембранных белков на целлюлозах DE-52 и KM-52 ("Whatman", Англия) и сефадексе DEAE A-5 ("Pharmacia", Швеция) [16]. Количество цитохрома  $b_{558}III$  определяли путем измерения плотности максимального оптического поглощения при 530 нм. Активность Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД) и СОД-миметическую активность витажена и антиокса определяли тремя методами: методом нитротетразолиевого синего (НТС), рассчитав проценты ингибирования образования формазана при 560 нм) при восстановлении НТС супероксидными радикалами ( $O_2^-$ ); методом кумасси бриллиантового синего (КБС) путем определения % подавления обесцвечивания этого красителя (при 580 нм) супероксидными радикалами, продуцируемыми при расщеплении перекиси водорода при рН выше 9 [10]; методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) непосредственным определением снижения интегральной интенсивности ЭПР сигнала  $O_2^-$  [11].  $O_2^-$ -продуцирующая активность фракции также была определена приведенными выше методами путем определения % повышения образования формазана и обесцвечивания КБС. НАДФН-зависимую супероксидпродуцирующую активность цитохрома  $b_{558}III$  определяли методом НТС, используя цитохром  $b_{558}III$  с  $A_{530}=0,4$ . Во всех случаях к реакционной смеси добавляли 0.15 мл цитохрома  $b_{558}III$ .

(объем реакционной смеси 3 мл) и  $4 \times 10^{-4}$  М НАДФН. Состав раствора:  $10^{-4}$  М НАДФН,  $6.3 \times 10^{-6}$  М феназин-метасульфат,  $3.6 \times 10^{-5}$  М НТС и 0.2 М натрий пирофосфатный буфер, pH 9 при  $20^\circ$ . За единицу СОД активности принимали то количество вещества (СОД, витажен, антиокс), которое способно ингибировать на 50% образование формазана или обесцвечивание КБС. За единицу  $O_2^-$ -продуцирующей активности принималось то количество вещества, которое стимулировало образование формазана на 50% при  $20^\circ$ . Катализную активность фракций определяли перманганометрией, рассчитав количество расщепленной перекиси водорода (М) определенным количеством фракции за 1 мин при  $20^\circ$ .

СОД, каталаза и церулоплазмин (ЦП) были получены и очищены из крови крыс по биотехнологическому способу путем ионообменной хроматографии отдиализованных белковых фракций гемолизата и сыворотки на целлюлозах DE-52 и KM-52 и сефадексе DEAE A-50 [5]. Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-VIS" (Германия) с длиной оптического пути 1 см. ЭПР спектры СОД и  $O_2^-$  регистрировали на спектрометре "Varian E-9" (США) со следующими параметрами: величина напряженности центрального магнитного поля 3000 Гаусс (Гс) с разверткой 2000 Гс; постоянная времени 0.3 сек; амплитуда модуляции 10 Гс; микроволновая мощность 10 мВт; микроволновая частота 9.08 ГГц; чувствительность регистрации ЭПР спектра  $5 \times 10^2$ ; температура пробы в резонаторе  $77^\circ$ К.

В состав используемого витажена фирмы "Ramkorpharm" (Болгария) входят: 0.2 г высушенных и

стертых в порошок лукович чеснока (Bulbus Allii Sativi pulv.), 50 г сухого экстракта женьшеня (Extr.ginsengi sicc), 100 ЦЕ витамина А, 20 мг витамина С; 6 ЦЕ витамина Е, а также соединения железа, марганца и цинка. В состав препарата антиокс (Antiox фирмы "Nutripharma LTD" "Group of Argopharma companies") входят: экстракт виноградной выжимки – 150 г; Гинко двудольная (Ginko biloba) – 26.5 мг; витамин С – 65 мг; витамин Е – 10 мг;  $\beta$ -каротин – 5 мг; селен – 50 мг; окись цинка – 18.5 мг. Витажен рекомендован для применения при нарушении сна, умственной и физической усталости, нарушениях иммунной защиты организма, депрессии, неврозах и атеросклерозе. Антиокс оказывает антиоксидантное действие, повышая активность иммунной системы и устойчивость организма к стрессовым факторам. Порошки витажена и антиокса (0.3г) были гомогенизированы в дистиллированной воде (20 мл), а смеси в дальнейшем использовали при разбавлении водой в различной степени.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера с определением критерия "Р".

## Результаты и обсуждение

При определении методом НТС витажен при пониженных концентрациях (меньше 0.2 мг/мл) оказывает антиоксидантное действие с СОД-миметической активностью 2000 ед/г. Витажен в концентрации – 1.2 мг/мл начинает стимулировать процесс образования формазана и полностью подавляет СОД (рис.1).

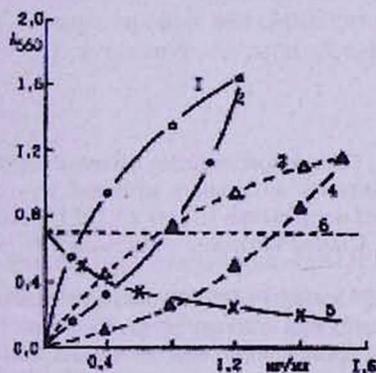


Рис. 1. Влияние витажена и антиокса на процесс образования формазана (при 560 нм) при восстановлении НТС супероксидными радикалами. К реакционной смеси добавляли: витажен (1); витажен и  $5 \times 10^{-8}$  М СОД (2); витажен и феррицианид ( $10^{-6}$  М) (3); витажен, СОД и феррицианид (4); приведенных веществ не добавляли (5); фоновый уровень формазана (6). Состав реакционной смеси:  $10^{-4}$  М НАДФН (НАДРН<sub>2</sub>),  $6.3 \times 10^{-6}$  М феназин метасульфат,  $3.6 \times 10^{-5}$  М НТС и 0.2 М натрий пирофосфатный буфер, pH 9. Объем реакционной смеси – 3 мл, время инкубирования – 15 мин при  $20^\circ$

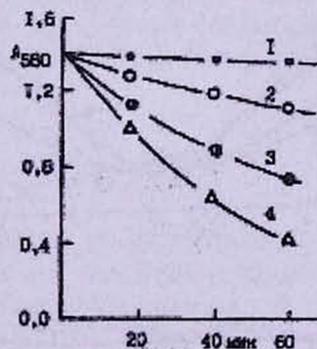


Рис. 2. Влияние витажена и антиокса на процесс обесцвечивания КБС ( $10^{-6}$  М) супероксидными радикалами, генерированными при расщеплении  $10^{-4}$  М  $H_2O_2$  при pH 9 при  $20^\circ$ : 1 – раствор КБС (3 мл) при pH 9 без добавления  $O_2^-$ ; 2 – это 1 после добавления 0.1 М  $O_2^-$  и антиокса; 3 – это 1 после добавления 0.1 М  $O_2^-$  и витажена; 4 – это 1 после добавления 0.1 М  $O_2^-$ .

Под влиянием окислителя (феррицианид) несколько подавляется процесс образования формазана (или процесс подавления продуцирования  $O_2^-$ ) с повышением его СОД-миметической активности. При более повышенных концентрациях (до 1.7 мг/мл) витажен инактивирует СОД. Можно констатировать, что в составе витажена присутствует восстановительная группа, которая передает свой электрон молекулярному кислороду, превращая его в  $O_2^-$ . Состав этой восстановительной группы пока не определен. Возможно, это связано с воздействием компонентов витажена. При другом методе определения СОД-активности восстановительная группа витажена не влияет на процесс обесцвечивания КБС (рис.2), и витажен в определенной степени улавливает  $O_2^-$ , генерированные при расщеплении перекиси водорода, тем самым оказывая

только антиоксидантное действие. Этот эффект наблюдается и при снижении витаженом интенсивности сигнала ЭПР  $O_2^-$  (рис.3). Причина инактивирования витаженом СОД и ЦП связана с необратимым восстановлением  $Cu(II)$  простетических групп этих металлопротеинов антиоксидантного действия. Как результат этого поглощения при 610 и 680 нм для ЦП и СОД интегральная интенсивность характерного сигнала ЭПР СОД падает в течение минуты с соответствующей кинетикой (рис.4). При этом обесцвечивание ЦП происходит гораздо быстрее, чем СОД. Таким образом, витажен в зависимости от используемой концентрации может обладать как антиоксидантным, так прооксидантным действием. Вполне вероятно, этим обусловлено адаптогенное действие витажена.

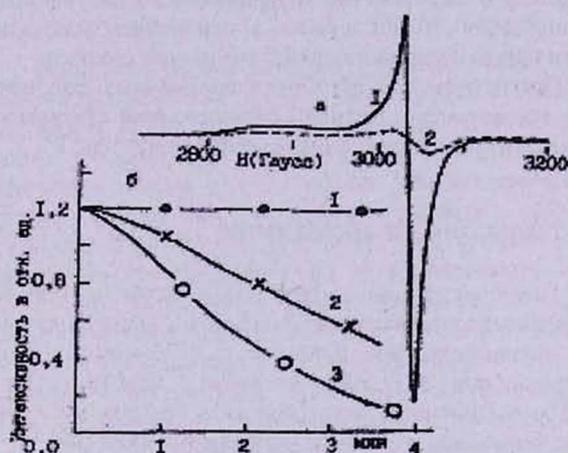


Рис. 3. Влияние витажена и антиокса на процесс снижения интегральной интенсивности ЭПР сигнала  $O_2^-$ : а-1 - ЭПР сигнала  $O_2^-$ , полученного при расщеплении  $10^{-2}$  М  $H_2O_2$  при pH 9,5. Время инкубирования раствора  $O_2^-$  - 2 мин при  $20^\circ$ ; 2 - это 1 после добавления 4 мг/мл витажена или антиокса; б - 1 - кинетическая кривая образования  $O_2^-$ ; 2 - это 1 после добавления витажена

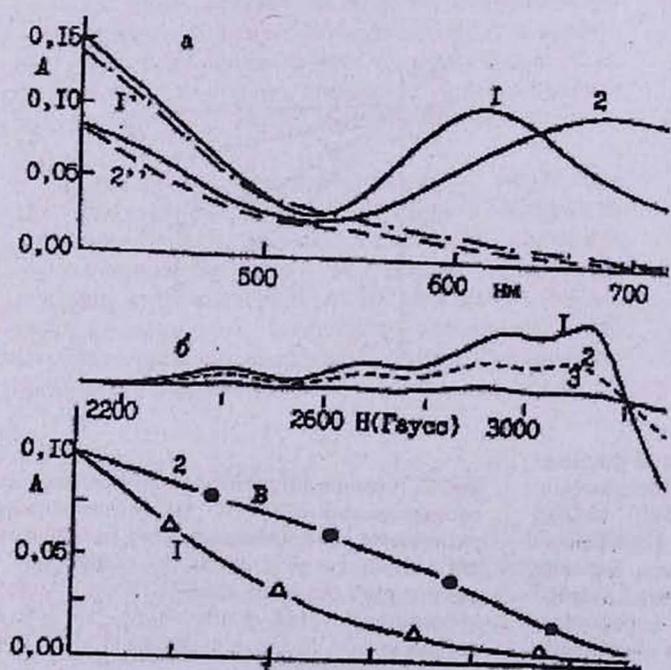


Рис. 4. Оптические спектры поглощения СОД и ЦП под влиянием витажена и антиокса: а - оптические спектры поглощения ЦП (1) и СОД (2) после добавления 4 мг/мл витажена к раствору ЦП (1') и СОД (2'). б - ЭПР спектры СОД (1); после добавления к 1 витажена (2); при его инкубации 2 мин при  $20^\circ$  (3); в - кинетические кривые восстановления  $Cu(II)$  ЦП (по оптико-спектральным данным) - (1) и СОД (по оптико-спектральным и ЭПР данным) - (2).

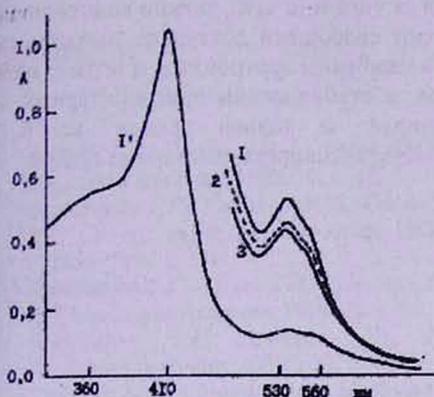


Рис. 5. Оптические спектры поглощения цитохрома  $b_{558}III$  под действием витагена и антиокса: 1 – оптический спектр поглощения цитохрома  $b_{558}III$ ; 2 – то же самое при инкубировании с 4 мг/мл витагена в течение 2 ч и 20 ч; 3 – это 1 после инкубирования с антиоксом в аналогичных условиях; 1' – это 2 или 3 после разбавления водой.

Антиокс не имеет восстановительную группу и является “чистым” антиоксидантом с СОД-миметической активностью 9000 ед/г. Эта активность определялась методами НТС, КБС и ЭПР (рис.1–3). Антиокс, в отличие от витагена, не обесцвечивает СОД и ЦП и не инактивирует эти металлопротеины. Антиокс и витаген не обладают каталазной активностью и не инактивируют каталазу. Они не повышают выход  $O_2^-$ , продуцируемых при расщеплении  $H_2O_2$  при рН 9 [10, 11], в отличие от хетаторов  $HO^*$  (спиртов,

сахаров, диметилсульфоксида, манитола и т.д.). Это свидетельствует о том, что антиоксидантное действие антиокса и витагена обусловлено не их  $HO^*$ -улавливающим эффектом, а  $O_2^-$ -нейтрализующим действием *in vitro*. Инкубирование цитохрома  $b_{558}III$  с витагеном и антиоксом приводит к некоторому изменению формы оптического спектра этого гемопротейна, нового структурно-функционального компонента мембран эритроцитов. Так, отношение  $A_{410}/A_{360}$  под воздействием витагена составляет 1.74, а под воздействием антиокса – 1.63 (это отношение нативного цитохрома  $b_{558}III$  составляет 2.24). При этом антиокс и витаген снижают интенсивность максимального оптического поглощения цитохрома  $b_{558}III$  при 530 нм на  $13.6 \pm 1.1\%$  ( $P < 0.02$ ) и  $16.1\%$  ( $P < 0.05$ ) соответственно (рис. 5). В то же время под воздействием витагена увеличивается NADPH-зависимая  $O_2^-$ -продуцирующая активность цитохрома  $b_{558}III$  и незначительно – под воздействием антиокса (таблица). Причем, в результате физической нагрузки продуцирование  $O_2^-$  цитохромом  $b_{558}III$  несколько снижается (сравнение с контрольными данными). Увеличение  $O_2^-$ -продуцирующей активности цитохрома  $b_{558}III$  *in vitro* и *in vivo* под воздействием витагена является одним из механизмов его адаптогенного действия, приводящих к интенсификации аэробных метаболических процессов, “истощенных” в результате повышенной физической нагрузки (истощение этих процессов, скорее всего, обусловлено снижением уровня  $O_2^-$ ). Адаптогенный механизм антиокса, возможно, связан только с антиоксидантным воздействием с соответственной нормализацией уровня  $O_2^-$  при повышенной физической нагрузке. Необходимо учитывать и то обстоятельство, что антиокс также повышает продуцирование  $O_2^-$  цитохромом  $b_{558}III$  при плавании. Как результат этого, при повышенной физической нагрузке в основном регулируется дисбаланс между металло-

Таблица

Относительные изменения NADPH-зависимой супероксидпродуцирующей активности цитохрома  $b_{558}III$  мембран эритроцитов под воздействием витагена и антиокса *in vitro* и после 20 мин плавания крыс *in vivo* по сравнению с контрольными показателями, которые принимаются за 100% ( $P < 0.05$ ,  $n=6$ )

Показатели	Относительные изменения (%)				
	после плавания (ОГ-1)	плавание + витаген (ОГ-2)	плавание + антиокс (ОГ-3)	+витаген	+антиокс
	<i>in vivo</i>			<i>in vitro</i>	
Уровень цитохрома $b_{558}III$	$-43.8 \pm 2.2$ ( $P < 0.02$ )	нет изм.	$-10.9 \pm 0.2$ ( $P < 0.01$ )	$-16.1 \pm 1.1$	$-13.6 \pm 1.0$
NADPH-зависим. $O_2^-$ -продуц. активность цитохрома $b_{558}III$	$-11.3 \pm 0.7$ ( $P < 0.02$ )	$+14.7 \pm 1.6$	$+10.2 \pm 1.1$ ( $P < 0.02$ )	$+25.1 \pm 2.2$	$+19.1 \pm 1.0$

протеинами анти- и прооксидантного действия. Однако если антиокс, с точки зрения этих факторов, не вызывает инактивирования ключевых антиоксидантных металлопротеинов (СОД и ЦП), то витажен в больших дозах может иметь нежелательные эффекты, приводя к инактивированию приведенных металлопротеинов антиоксидантного действия.

Исходя из того, что витажен и антиокс в основном

действуют одинаковым образом на состояние металлопротеинов *in vitro* и *in vivo*, можно констатировать, что они имеют свободный доступ не только в сыровотку, но и в мембраны эритроцитов и играют определенную роль в стабилизации эритроцитарных мембран, регулируя не только уровни, но и О<sub>2</sub>-продуцирующую активность цитохрома b<sub>558</sub>III.

Поступила 27.09.

### Աղստուգումներ վիտամինի և անտիօքսի հակաօքսիդանտային ակտիվությունը և նրանց ազդեցությունը աղյան մետաղապրոտեինների ֆիզիկաքիմիական հատկությունների վրա *in vitro* և *in vivo*՝ առնետների ֆիզիկական ծանրաբեռնվածությունից հետո

Ն.Ա.Բաղդասարյան, Ռ.Դ.Բորոյան, Մ.Ա.Սիմոնյան

Անտիօքսի հակաօքսիդանտային հատկությունը շուրջ երեք անգամ ավելի է քան վիտամինինը: Վերջինիս կազմում հայտնաբերվել է վերականգնիչ խումբ (ի տարբերություն անտիօքսի), որը գոյացնում է սուպերօքսիդ ռադիկալներ՝ բարձր դոզաների ժամանակ: Այդ բանի շնորհիվ վիտամինը անդարձելիորեն վերականգնում է Cu,Zn-սուպերօքսիդիտուտազի և ցերուլոպլազմինի ակտիվ խմբի պրոնի, ակտիվազրկելով այդ մետաղապրոտեիններին: Այս հանգամանքը պետք է հաշվի առնել և խուսափել վիտամինի բարձր դոզաների օգտագործումից: Վիտամինը և անտիօքսը չունեն կատալազային ակտիվություն և չեն կլանում

հիդրօքսիլ ռադիկալները: Այդ աղստուգումները գործնականորեն մամանտիա կերպով են փոփոխում էրիթրոցիտների քաղաքների ցիտոքրոմ b<sub>558</sub> օպտիկական կլանման սպեկտրի ձևը, բարձրացնելով նրա NADPH-կախյալ սուպերօքսիդ գոյացնելու հատկությունը *in vitro* և *in vivo*՝ առնետների ֆիզիկական ծանրաբեռնվածությունից (20 տևողությամբ ստիպողական լող) հետո:

Ենթադրվում է, որ նշված բուսական ծագումնապատկանների ազդեցության մեխանիզմները կարող են կապված լինել ոչ միայն սուպերօքսիդների չեզոքացման, այլ նաև գոյացման հետ:

### The antioxidative activity of adaptogens vitajen and antiox and their influence on the physico-chemical properties of the rats' blood metalloproteins *in vitro* and *in vivo* after physical load

N.A.Baghdasaryan, R.G.Boroyan, M.A.Simonyan

The antioxidative activity of antiox is 3 times higher than that of vitajen. In the composition of the latter it has been detected a reductive group which produces superoxide radicals at high dosage. As a result, vitajen reduces Cu<sup>+2</sup> in the active group of Cu,Zn-SOD and ceruloplasmin and irreversibly inactivates these metalloproteins. It should be taken into account and to avoid using vitajen in high dosages.

Vitajen and antiox do not change the catalase activity

and haven't catalase or HO<sup>•</sup>-chelating activity. The adaptogens practically similarly change the form of optical absorption spectrum of erythrocyte membrane cytochrome b<sub>558</sub>III and elevate its NADPH-dependent superoxide producing activity *in vitro* and *in vivo* after physical load in rats (forced swimming during 20 min).

It is supposed that the mechanisms of these adaptogens of plant origin are connected not only with the action of superoxide neutralization, but also with its production.

## Литература

Амирян Л.Т., Симонян М.А., Овьян Г.А., Бороян Р.Г. Мед.наука Армении, 1999, 39, с. 42.

Багдасарян Г.Г., Симонян М.А., Овьян Г.А., Бороян Р.Г. Сб.мат. научн.-практич.конф. ЦКВГ МО РА. Ереван, 1998, с. 116.

Багдасарян Г.Г., Овьян Г.А., Симонян М.А., Бороян Р.Г. Мед.наука Армении, 1999, 39, с. 84.

Багдасарян Н.А., Симонян М.А., Бороян Р.Г. Мед.наука Армении, 2001, LXI, с. 44.

1. Симонян М.А., Симонян Г.М., Мелконян Р.В. Лицензия изобретения N341, Патентное управление РА, 1997.

5. Симонян М.А., Симонян Г.М., Григорян Г.Г., Симонян Р. М. Способ получения цитохромов b из мем-

бран эритроцитов. Лицензия Армпатента N 908. Ереван, 2001.

7. Maslova L.V., Lishmanow Z.B., Maslow L.I. Biol.Med., 1993,115:261.

8. Novikov V.S., Shamarin I.A., Bortnovskii B.N. Voen.Med.Zh., 1992, 8:47.

9. Parmanovaq M.S., Gagarina V.M., Podina M.A. et al. Vopr.Virusol., 1994, 39:131.

10. Symonyan M.A. Biochem.Biophys.Res.Comm., 1982, 108:1751.

11. Symonyan M.A., Nalbandyan R.M. Biochim.Biophys.Acta, 1979, 583:279.

12. Undibsev S.H., Krylova S.G., Konovalova O.N. Byull.Exp.Biol.Med., 1991, 112:599.