

УДК 616.36 - 002 - 099.3

©Коллектив авторов

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОГО И АНТИАТЕРОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ ПРИРОДНОГО И СЕЛЕНОРГАНИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ.

В.Р. Хачатурова¹, И.В. Супрун², А.В. Васильев¹.

¹ГУ НИИ питания РАМН, 109240, Москва, Устьинский пр-д, 2/14;

тел.:113-15-92; факс:113-07-09; эл. почта:celada@unet.ru

²РК НИК Минздрава РФ, 121552, ул. 3-я Черепковская, 15а;

На моделях первичной культуры интимальных клеток аорты человека и культуры макрофагов человека исследовали антиоксидантное и антиатерогенное действие препаратов природного происхождения - комплекса изофлавонов сои и селенорганического происхождения - селенопирана, диметилпирасолил селенида. Полученные результаты свидетельствуют, что комплекс изофлавонов сои проявляет преимущественно антиатерогенные свойства, а органические соединения селена - антиоксидантные.

Ключевые слова: антиоксиданты, атерогенность, макрофаги, клетки интимы аорты

ВВЕДЕНИЕ. Дисбаланс между интенсивностью свободнорадикальных процессов и функциональной активностью антиоксидантной системы (АОС) часто является либо следствием, либо причиной тех или иных патологических изменений в клетках и тканях. Перечень заболеваний и патологических состояний, в развитии которых одним из ключевых звеньев являются нарушения антиоксидантного статуса достаточно велик и включает, в частности, атеросклероз, нейродегенеративные заболевания, сахарный диабет, катаракту, некоторые формы рака, болезнь Дауна и др. [1-3].

Широкая, если не сказать всеобщая, встречаемость нарушений баланса интенсивности свободнорадикального окисления (СРО) и функционального статуса АОС при патологии, а также способность усиления интенсивности СРО значительно отягощать течение любого заболевания диктуют необходимость поиска путей фармакологической и диетологической коррекции нарушений указанного баланса. Многочисленные исследования показали, что АОС представляет собой многокомпонентный метаболический конвейер, в значительной мере определяющий состояние гомеостаза. Следовательно, применение антиоксидантов при различных патологиях, в том числе при сердечно-сосудистых заболеваниях, которые характеризуются широкой распространенностью и ведут к снижению социальной активности и качеству жизни, является наиболее перспективным направлением в современной профилактической медицине [4-8]. Такими средствами могут являться антиоксиданты природного и биоорганического происхождения.

Цель настоящего исследования - оценить антиоксидантный и антиатерогенный эффекты природных антиоксидантов - комплекса изофлавонов сои и селенорганических антиоксидантов на моделях первичной культуры интимальных клеток аорты человека и культуры макрофагов человека.

АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИАТЕРОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ СОИ И СЕЛЕНА

МЕТОДИКА. *Выделение и культивирование гладкомышечных клеток интимы аорты человека.* Клетки были получены из аорт мужчин и женщин в возрасте 40-65 лет в течение 1,5-2 часов после внезапной смерти. Причиной смерти в большинстве случаев была острая сердечно-сосудистая недостаточность. Субэндотелиальные гладкомышечные клетки выделяли из непораженных участков интимы аорты человека путем обработки коллагеназой и культивировали в соответствии с методом Орехова и сотр. [9,10]. В стерильных условиях после механического удаления адвентиции аорту разрезали вдоль и промывали в среде 199, содержащей по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина и 2,5 мкг/мл фунгизона. Из лоскута аорты вырезали участки, не имеющие видимых атеросклеротических поражений, а также жировые полосы и атеросклеротические бляшки. Затем с помощью пинцетов интиму отделяли от меди, при этом разрыв шел по внутренней пограничной эластической мембране [9]. Полученный материал пинцетами разделяли на волокна. К измельченной интиме добавляли 0,15% раствор коллагеназы II типа ("Worthington Diagnostic System", США) в среде 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки ("Flow", Великобритания), 2 мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина, 100 ед/мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл фунгизона (все реактивы "GIBCO", США) из расчета 10 мл раствора фермента на 1 г сырой ткани. Интиму обрабатывали коллагеназой при 37°C на водяной бане с постоянным перемешиванием со скоростью 50 об/мин ("Aquatarm", США) до практически полного растворения ткани, что обычно занимало 2-3 часа. Полученную суспензию клеток фильтровали через нейлоновую сетку и центрифугировали при 4°C в течение 20 мин при 1000 об/мин Beckman TJ-6 ("Beckman Industrial Estate Mervue", Ирландия). Осажденные клетки промывали в 10 мл ростовой среды 199, содержащей антибиотики и 10% эмбриональную телячью сыворотку, и повторно центрифугировали при тех же условиях. Осадок ресуспендировали в 10 мл 199 среды и производили подсчет полученного количества клеток в счетной камере. Суспензию клеток вносили в пластиковый стерильный 48-гнездный планшет для тканевых культур ("Nuclon", Дания) из расчета $(2-4) \times 10^4$ клеток/см². Клетки культивировали при 37°C в насыщенной водяными парами атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% углекислого газа, в CO₂-инкубаторе ("Forma Scientific", США). Смену среды проводили через день. Для экспериментов использовали 7-10-дневную первичную культуру клеток.

Для изучения антиатерогенного эффекта использовали атерогенную сыворотку больных. Сыворотка считалась атерогенной, если за 24 часа инкубации с гладкомышечными клетками, выделенными из непораженной интимы аорты человека, она вызывала статистически значимое накопление внутриклеточного холестерина.

В день эксперимента культуральную среду заменяли на свежую среду 199. На 7 день препараты изофлавонов сои, селенопирана, диметилпирасолил селенида в концентрациях 10 мкг/мл, 1 мкг/мл, 0,1 мкг/мл вместе с атерогенной сывороткой добавляли в культуру клеток и спустя 24 часа определяли содержание суммарного внутриклеточного холестерина и клеточного белка. В работе использовали: смесь соевых изофлавонов "NOVASOY" (общее содержание изофлавонов не менее 40%; соотношение генистина, даидзина и глицитина 1,3:1,0:0,3) ("ADM Nutraceutical", США), селенопиран (9-фенил-симметричный октагидроселеноксантен) (ООО "Биокор", Пенза), диметилпирасолил селенида (ООО "Ареал", Ростов-на-Дону).

Определение содержания внутриклеточного холестерина. Спустя 24 ч клетки отмывали 5 раз изотоническим фосфатным буфером, после чего трижды экстрагировали смесью гексана и изопропанола (3:2, объем/объем). Каждая экстракция продолжалась по 30 мин. Экстракт переносили в чистый 96-гнездный микротест и упаривали при комнатной температуре в токе воздуха. Полученный сухой осадок растворяли в 25 мкл раствора, содержащего 15 мМ холат натрия и 0,05% тритон X-100 ("Sigma", США), добавляли по 25 мкл изопропанола и по 100 мкл раствора "Monotest" ("Boehringer Mannheim", Германия) для определения общего

холестерина с помощью наборов фирмы ("Boehringer Mannheim"). Смесь инкубировали при 37°C в течение 30 мин, после чего измеряли оптическую плотность проб при длине волны 492 нм на Multiskan Bichromatic ("Labsystems OY", Финляндия) и рассчитывали содержание общего холестерина в каждой пробе [9,10]

Измерение клеточного белка. Фиксированные на пластике клетки после экстракции липидов растворяли в 50 мкл 0,2 М NaOH при комнатной температуре в течение 12-16 часов, после чего определяли содержание клеточного белка в каждой пробе по методу Lowry et al. [11].

Антиоксидантный эффект определяли по содержанию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клетках, оценивая уровень субстанций, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) по методу Yagi [12]. Для стимуляции свободнорадикальных процессов в клеточные культуры предварительно вносили атерогенную сыворотку больных.

Для изучения процессов накопления внутриклеточных липидов в настоящее время используют первичную культуру макрофагов - производных моноцитов крови человека [13].

Выделение моноцитов крови человека. Из локтевой вены здорового донора с утра натощак брали 50 мл крови в стерильную пластиковую пробирку, содержащую 5 мл стерильного цитрата натрия 3,8% в ИФБ. Кровь центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин на центрифуге TJ-6 ("Beckman"). Плазму отбрасывали, оставшуюся часть, содержащую форменные элементы крови, доводили до первоначального объема стерильным ИФБ. В стерильную пластиковую пробирку вносили Ficoll ("Flow Laboratories") из расчета 0,5 мл на 1 мл полученной суспензии форменных элементов крови. На Ficoll наслаивали суспензию форменных элементов крови и центрифугировали 30 мин при 3000 об/мин. Фракцию моноцитов и лимфоцитов отбирали в стерильных условиях. Полученную фракцию моноцитов и лимфоцитов суспендировали в 1 мл стерильного ИФБ, доводили стерильным ИФБ до 50 мл и центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Осадок моноцитов и лимфоцитов суспендировали в 1 мл стерильного ИФБ, доводили до 50 мл стерильным ИФБ и центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Моноциты и лимфоциты отмывали еще 2 раза стерильным ИФБ, как описано выше. Осадок моноцитов и лимфоцитов суспендировали в 1 мл среды 199. Количество полученных моноцитов и лимфоцитов подсчитывали под микроскопом в гемоцитометре при десятикратном увеличении в 5 больших квадратах. Количество моноцитов и лимфоцитов подсчитывали по формуле: Количество клеток = $N \cdot 5 \cdot 10^5 \cdot V$, где N - количество клеток в 5 квадратах, V - объем суспензии моноцитов.

Культура макрофагов человека. К полученным моноцитам и лимфоцитам добавляли 10 мл среды 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотики, как описано выше. Осадок ресуспендировали в 10 мл той же среды и производили подсчет полученного количества клеток в счетной камере, как описано выше. Суспензию клеток вносили в пластиковый стерильный 48-гнездный планшет для тканевых культур ("Nuclon") с плотностью $(1-2) \times 10^5$ инкубировали в CO₂-инкубаторе при 100 % влажности и 37°C в течение 14 суток со сменой инкубационной среды через каждые 48 часов. В экспериментах использовали культуру на 14-й день культивирования.

В культуре клеток определяли внутриклеточный холестерин, клеточный белок, продукты ПОЛ методами, описанными выше.

Статистическая обработка данных. Достоверность отличий значений определяли с помощью двустороннего t-теста Стьюдента, отличия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Анализ полученных результатов по оценке антиоксидантных свойств исследуемых соединений на модели различных культур клеток (см. таблицу) свидетельствует, что наиболее высокую антиоксидантную активность в культуре макрофагов проявлял диметилпирасолил селенид. При его внесении в наименьшей концентрации выявлено снижение ТБК-

АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИАТЕРОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ СОИ И СЕЛЕНА

продуктов на 26% по сравнению с контролем с атерогенной сывороткой (контроль-АС), тогда как для изофлавонов сои и селенопирана снижение ТБК-продуктов составляло 18% и 13% соответственно. При внесении в культуру макрофагов наряду с атерогенной сывороткой исследуемых препаратов в максимальной концентрации 10 мкг/мл достоверный антиоксидантный эффект обнаружен у всех препаратов, о чем свидетельствует снижение содержания ТБК-продуктов на 48-54%. В эксперименте на культуре клеток интимы аорты человека наибольший антиоксидантный эффект получен у препаратов диметилпирасолил селенида и селенопирана. При внесении этих соединений в минимальной концентрации снижение содержания ТБК-продуктов составило 12% и 15% соответственно, а в концентрациях 1 мкг/мл и 10 мкг/мл снижение ТБК-продуктов составляло в среднем 22-28% и в том, и в другом случае. При внесении изофлавонов сои в культуру в концентрации 0,1 мкг/мл антиоксидантный эффект не выявлен. При увеличении концентрации до 1 мкг/мл снижение содержания ТБК-продуктов составило 22%, с дальнейшим увеличением концентрации дозозависимый эффект не выявлен и при концентрации 10 мкг/мл снижение ТБК-продуктов составило также 22%.

При сравнении антиатерогенных свойств в культуре макрофагов человека наибольший антиатерогенный эффект был получен у селенопирана в концентрациях 1 мкг/мл и 10 мкг/мл - происходило достоверное снижение содержания внутриклеточного холестерина на 20% и 24% соответственно по сравнению с контролем-АС. При минимальной концентрации (0,1 мкг/мл) селенопиран вызывал снижение содержания внутриклеточного холестерина в

Таблица. Влияние диметилпирасолил селенида, селенопирана, изофлавонов сои на содержание продуктов ПОЛ в клеточных культурах.

Исследуемые препараты	Содержание ТБК-продуктов, мкг/мг белка	
	Культура клеток интимы аорты	Культура макрофагов
контроль	55,2±7,73	280,2±33,62
контроль -АС	104,88±8,28*	459,53±42,03*
диметилпирасолил селенид 0,1 мкг/мл	88,32±13,8	339,04±14,01
диметилпирасолил селенид 1 мкг/мл	82,8±5,52**	311,02±36,43**
диметилпирасолил селенид 10 мкг/мл	76,18±1,1**	238,17±67,25**
селенопиран 0,1 мкг/мл	90,53±9,38	400,69±25,22
селенопиран 1 мкг/мл	83,35±6,07**	350,25±42,03
селенопиран 10 мкг/мл	77,83±6,62**	224,16±2,8**
изофлавоны 0,1 мкг/мл	103,64±11,04	378,27±5,6**
изофлавоны 1 мкг/мл	83,35±9,38	367,06±30,82**
изофлавоны 10 мкг/мл	82,25±8,28	210,15±33,62**

Примечание: * достоверное накопление ТБК-продуктов, по сравнению с контролем $p < 0,05$;

** достоверное снижение содержания ТБК-продуктов по сравнению с контролем-АС, $p < 0,05$.

культуре на 13%. В свою очередь диметилпирасолил селенид в концентрации 0,1 мкг/мл снижал содержание внутриклеточного холестерина на 14%, однако антиатерогенное действие диметилпирасолил селенида в концентрации 1 мкг/мл снизилось и составило 7%, при концентрации 10 мкг/мл проявлялся токсический эффект, который определялся по резкому снижению содержания клеточного белка (рис. 1). При исследовании антиатерогенного эффекта комплекса соевых изофлавонов были получены следующие результаты (рис. 2): уже при внесении в концентрации 0,1 мкг/мл (спиртовой раствор) обнаружилось снижение содержания внутриклеточного холестерина на 22% при сравнении с контролем-

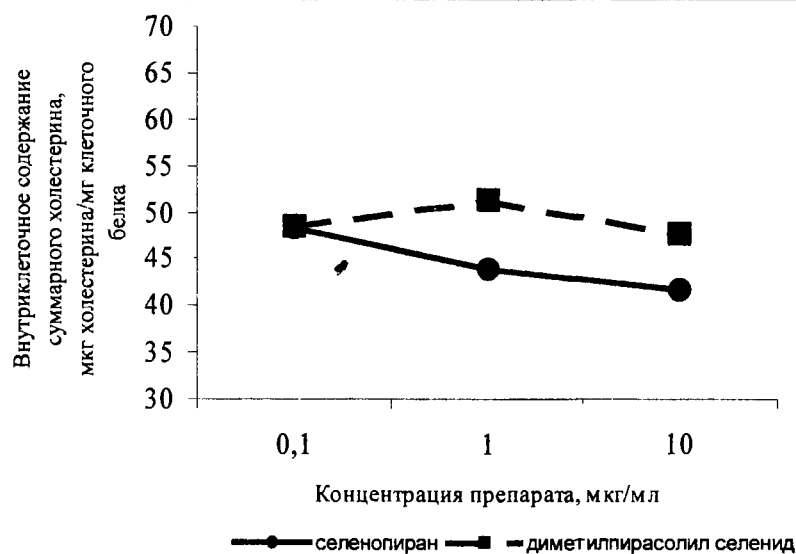


Рисунок 1.

Влияние препаратов селена на содержание суммарного холестерина.

АС, однако при увеличении концентрации препарата дозозависимого эффекта выявлено не было и снижение внутриклеточного холестерина оставалось на том же уровне. В культуре клеток интимы аорты человека наибольший эффект выявлен у комплекса изофлавонов сои: при внесении в культуру в концентрации 0,1 мкг/мл антиатерогенный эффект составил 10%, в концентрациях 1 мкг/мл и 10 мкг/мл происходило достоверное снижение содержания внутриклеточного холестерина по сравнению с контролем-АС на 21% и 27% соответственно. При внесении селенопирана в минимальной концентрации (0,1 мкг/мл) произошло снижение содержания внутриклеточного холестерина по сравнению с контролем-АС на 11%, в концентрациях 1 мкг/мл и 10 мкг/мл в среднем на 23 - 27%. Диметилпирасолил

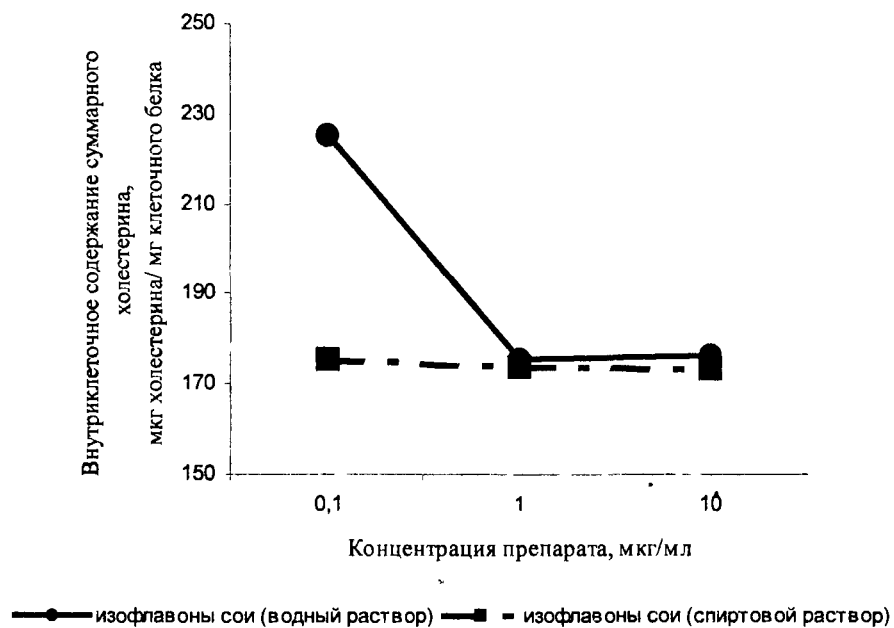


Рисунок 2

Влияние смеси соевых изофлавонов на содержание суммарного холестерина в культуре макрофагов человека

АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИАТЕРОГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ СОИ И СЕЛЕНА

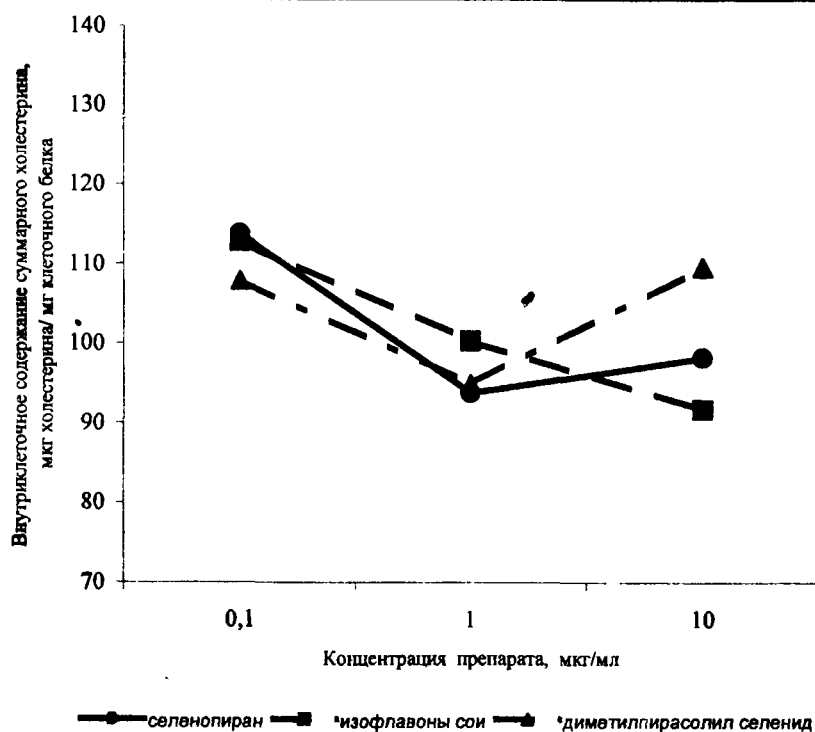


Рисунок 3.

Влияние препаратов селена и изофлавонов сои на содержание суммарного холестерина в культуре клеток интимы аорты.

селенид в концентрациях 0,1 мкг/мл и 1 мкг/мл снижал содержание суммарного внутриклеточного холестерина в культуре на 13% и 27% соответственно, в концентрации 10 мкг/мл оказывал выше описанный токсический эффект (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют, что комплекс изофлавонов сои на использованных моделях культур клеток проявляет преимущественно антиатерогенные свойства, а органические соединения селена - антиоксидантные. Совокупность полученных результатов дает основание рассматривать исследованные препараты в качестве перспективных компонентов биологически активных добавок (БАД) к пище и целесообразность их сочетанного использования в комплексной диетотерапии сердечно-сосудистых заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинина Е.Е. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 561-581.
2. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. (1991) *Свободные радикалы в живых системах. Биофизика (Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР)*, М., 29
3. Vladimirov Y.A. (1986). *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*. N.Y., London, Alan R. Liss Inc., pp.141-195
4. Visioli F, Galli C. (1997) *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, №7, 459-466.
5. Тумельян В.А., Погужева А.В., Высоцкий В.Г. и др. (2000) *Вопр. питания.*, №5, 43-51.
6. Brown L.A.S., Jones D.P. (1996) In: *Handbook of Antioxidants*, N.Y. - Basel-Hong Kong, pp.117-154.
7. Rice-Evans C.A., Diplock A.T. (1993) *Free Radic. Biol. Med.*, **15**, 77-96.

8. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. (2000) Кардиология, №7, 48-57.
9. Orekhov A.N., Tertov V.V., Novikov I.D. et al. (1985). Exp. Mol. Pathol., **41**, 117-137
10. Орехов А.Н. (1998) Роль модифицированных липопротеидов и интимальных клеток в развитии атеросклероза. Автореф. Дис...докт. биол. наук. Санкт-Петербург.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L. et al. (1951) J.Biol.Chem., **193**, 265-275
12. Yagi K. (1984). Methods Enzymol., **105**, 328-333
13. Brown M.S., Goldstein I.L. (1983). Ann. Rev. Biochem, **52**, 223-229

Поступила 07.07.02

**COMPARATIVE EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIATHEROGENIC EFFECTS
OF NATURALLY OCCURING COMPOUNDS AND SYNTHETIC ORGANIC
COMPOUNDS OF SELENIUM.**

V.R. Khachaturova¹, I.V. Suprun², A.V. Vasiljev¹

¹Institute of Nutrition RAMS; Ustinsky proezd, 2/14, 109240, Moscow;
tel: (095)113-15-92; fax: (095) 113-07-09; e-mail: celada@unet.ru

² Cardiology Research Center of Russia; 3-rd Cherepkovskaya, 15a, 121552, Moscow

The antioxidant and atherogenic effects of naturally occurring compounds (soya isoflavones) and of the synthetic organic compounds of selenium (selenopyran and dimethyl-pyrosalyl-selenide) on the primary cell culture of human aortic subendothelial intima and on macrophage cell culture were investigated. Our results suggest that soya isoflavones exhibit mainly antiatherogenic effect and organic compounds of selenium exhibit mainly antioxidant effect.

Key words: antioxidants, atherogenicity, macrophage, cells of human aortic subendothelial intima