

# ГЕНОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ФЛАВОЛИГНАНОВ ИЗ СЕМЯН РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ (*SILYBUM MARIANUM L.*)

А.С. Щекатихина, В.П. Курченко

Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь

## Введение

Возникновение и развитие некоторых онкологических заболеваний населения связывают с действием чужеродных веществ, в том числе и лекарственных препаратов. Многие из них способны вызывать изменения в нативной структуре ДНК. Такими повреждениями являются: одно- и двунитевые разрывы, межнитивые сшивки, сшивки ДНК-белок, реаранжировки, нарушения физиологического метилирования ДНК, амплификация генов, хромосомные aberrации, приводящие к генным или хромосомным мутациям. Основными факторами, вызывающими структурные изменения ДНК, являются свободные радикалы, образующиеся в ходе метаболических превращениях ксенобиотиков. Среди генотоксичных веществ большую группу составляют ароматические амины, которые широко применяются в анилинокрасочной, резинотехнической промышленности, а также при производстве пластмасс. Наименее изученной группой канцерогенных ароматических аминов являются аминобифенилы, которые могут вызывать злокачественные новообразования у животных и человека. Бензидин и его производные в ходе метаболических превращений образуют электрофильные радикальные продукты окисления, которые взаимодействуют с нуклеофильными группами ДНК, что может приводить к образованию перекрестных сшивок ДНК [1]. Такие аминобифенилы, которые после метаболической активации в организме вызывают образование опухолей, называются канцерогенами непрямого действия. Большинство проканцерогенов гидрофобны, и их выведение из организма сводится к образованию гидрофильных метаболитов. Основными реакциями биотрансформации аминобифенилов являются процессы их окисления с участием пероксидаз и монооксигеназ. В ходе пероксидазного окисления бензидаина и его производных образуются высокорективные производные, ковалентно связывающиеся с клеточными белками и нуклеиновыми кислотами [2].

Вещества, способные связывать свободные радикалы окисленных аминобифенилов, выступают в качестве генопротекторов. Такое антимуагенное действие характерно для многих фенольных соединений растительного происхождения. Представляется целесообразным исследовать возможность проявления генопротекторных свойств силимарина и отдельными флаволигнанами, входящими в эту субстанцию.

Силимарин – липофильный экстракт плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum L.*), состоящий из изомеров флаволигнанов [3, 4]. В состав силимарина входят: силибин, силикрестин и силидианин с небольшим содержанием других стереоизомеров (рисунок 1), а также флавоноид - таксифолин.

Все три основных компонента силимарина: силибин, силикрестин и силидианин являются производными таксифолина и кониферилового спирта. Наличие лигниновой или лигнановой группировки позволило отнести эти соединения к флаволигнанам. [6]. Дополнительный фенилпропаноидный фрагмент (конифероловый спирт) дает основание отнести флаволигнаны не только к флавоноидам, но и фенилпропаноидам [7]. Силибин является основным компонентом силимарина, и, как правило, составляет 50-70 % всех флаволигнанов [3].

Силимарин нашел широкое применение в качестве гепатопротекторного препарата. Терапевтическая эффективность препаратов из плодов расторопши пятнистой базируется на нескольких механизмах действия: силибин стимулирует рибосомный синтез протеина, что приводит к усилению регенерации клеток печени; флаволигнаны оказывают стабилизирующее действие на мембраны гепатоцитов и предотвращают проникновение гепатотоксинов во внутреннюю часть клетки [6]. Все эти эффекты связаны с

антирадикальными свойствами флаволигнанов [3]. Помимо гепатопротекторной активности, силимарин проявляет противораковую, противовоспалительную, иммуномодулирующую и кардиопротекторную активности [8, 9, 10].

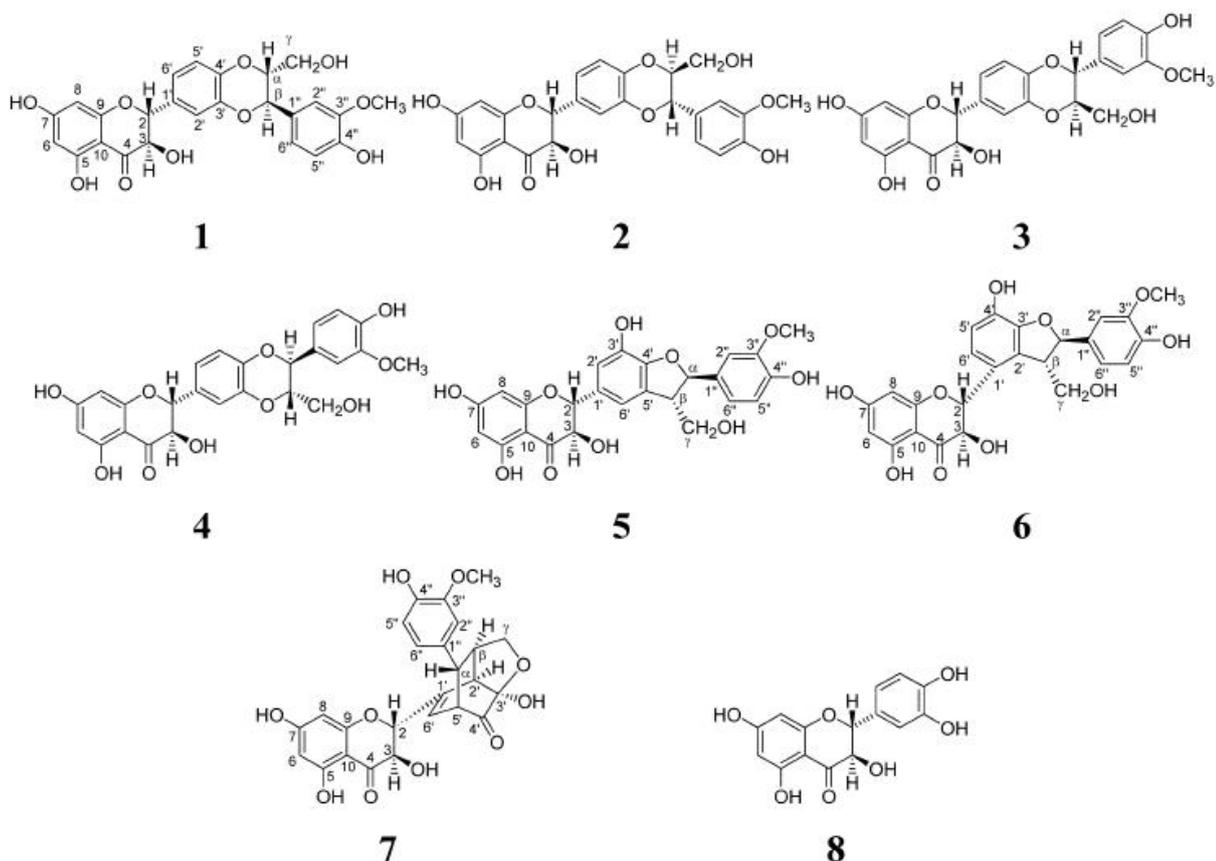


Рисунок 1 – Структурные формулы компонентов силимарина [5]: 1 – силибин А, 2 – силибин В, 3 – изосилибин А, 4 – изосилибин В, 5 – силикрестин, 6 – изосиликрестин, 7 – силидианин, 8 – таксифолин.

Терапевтические эффекты силимарина и отдельных флаволигнанов многочисленны и разнообразны. Однако, имеется небольшое количество работ, посвященных выявлению гепопротекторной активности этих биологически активных соединений.

Таким образом, целью работы явилось исследование гепопротекторных свойств индивидуальных флаволигнанов из семян расторопши пятнистой: силибина, силикрестина и силидианина на модели повреждения ДНК пероксидазными оксидантами бензида и его производными.

Для решения этой цели, нами были поставлены следующие задачи:

- исследовать особенности повреждения ДНК продуктами пероксидазного окисления бензида, 3,3'-диметилбензида, 3,3'-диметоксибензида, и 3,3',5,5'-тетраметилбензида;
- провести сравнительное изучение ингибирования процесса повреждения ДНК флаволигнанами: силибина, силидианина и силикрестина.

#### Методы исследования

Получение флаволигнанов из семян расторопши пятнистой осуществляли по стандартной методике [11] методом тройной спиртовой экстракции. Индивидуальные флаволигнаны: силибин, силикрестин и силидианин получали при помощи препаративной

колоночной хроматографии. В качестве сорбента использовали Тоуорpearl HW-40 (колонка 1,6x65 см, элюент – 50 % изопропиловый спирт).

Генопротекторные свойства индивидуальных флаволигнанов исследовали на модели повреждения ДНК фага  $\lambda$  продуктами пероксидазного окисления аминобифенилов. Пероксидазное окисление аминобифенилов в присутствии ДНК фага  $\lambda$  проводили в 0,1 моль/л Трис-НСl буфере (рН 7,4) с добавлением 0,05% Твин 20 в общем объеме реакционной смеси равном 20 мкл. Реакционная смесь содержала ДНК фага  $\lambda$  (0,5 мкг), пероксидазу хрена ( $1 \times 10^{-7}$  моль/л), различные концентрации бензидина, диметилбензидина, диметоксибензидина и тетраметилбензидина ( $0,2 \times 10^{-7}$  моль/л –  $1 \times 10^{-5}$  моль/л). Реакцию запускали добавлением перекиси водорода (1 ммоль/л), после чего смесь инкубировали 60 мин при  $25^\circ\text{C}$ . Для исследования способности флаволигнанов предотвращать повреждения ДНК, в реакционную смесь вносили различные концентрации силимарина, силикристина, силибина и силидианина ( $0,14 \times 10^{-6}$  –  $4,15 \times 10^{-5}$  моль/л). Концентрацию флаволигнанов определяли спектрофотометрическим методом с использованием коэффициента молярной экстинкции для силибина  $\epsilon = 21983,75$  моль $^{-1}$ см $^{-1}$ . Для детекции повреждений ДНК фага  $\lambda$  применяли горизонтальный электрофорез в 0,9% агарозном геле в 0,04 моль/л Трис-ацетатном буфере рН 8,5 с добавлением 0,001 моль/л ЭДТА [12, 13]. Для визуализации ДНК использовали флуоресцирующий краситель – бромистый этидий. Гель фотографировали в УФ-свете [1].

### Результаты и обсуждение

В настоящее время в лабораторной практике широко используются разнообразные методы для оценки генотоксичности различных химических соединений. Как правило, эти методические подходы не описывают изменений в функционировании генов, а указывают на возможность повреждения носителей генетической информации.

Бензидин в ходе пероксидазного окисления теряет последовательно два электрона и превращается в хиноидное соединение (рисунок 2). Продукты метаболической активации способны взаимодействовать с донорами электронов мономеров ДНК. Благодаря большой реакционной способности N-7-гуанина в ДНК возможно его алкилирование агентами с двумя реакционноспособными центрами, такими как комплекс с переносом заряда (рисунок 2). В результате этой реакции должно происходить образование ковалентных межнитевых сшивок ДНК. Эти повреждения являются мерой генотоксичности бензидина и его производных.

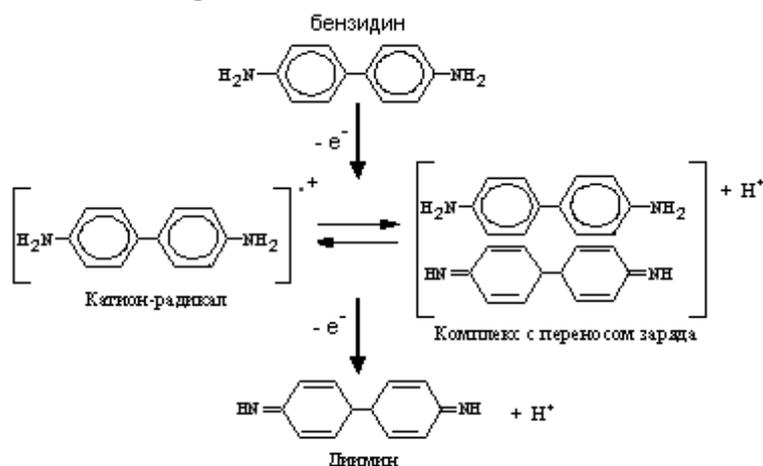
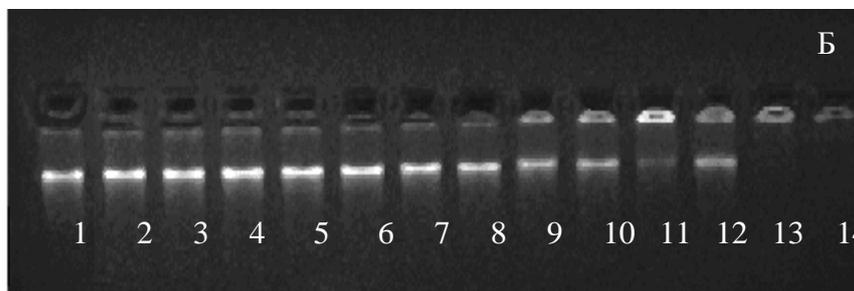
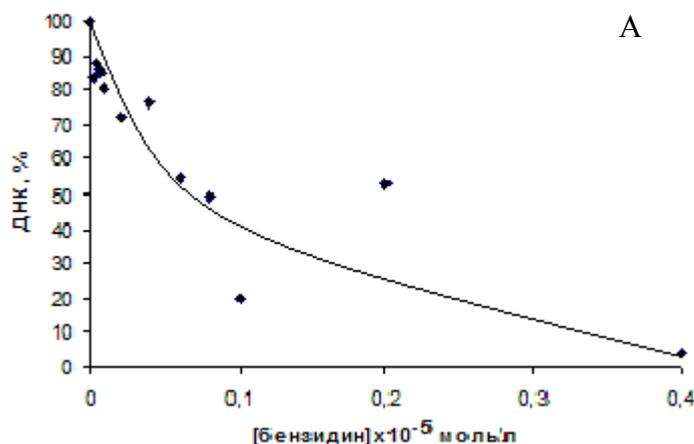


Рисунок 2 – Механизм окисления бензидина [14]

Исследование генопротекторных свойств индивидуальных флаволигнанов проводили на модели повреждения ДНК фага  $\lambda$  свободнорадикальными продуктами пероксидазного окисления известного канцерогена – бензидина и его производных с

убывающей канцерогенной активностью: 3,3'-диметилбензидаина, 3,3'-диметоксибензидаина и 3,5,3',5' - тетраметилбензидаина.

Процесс образования поперечных сшивок ДНК в присутствии продуктов пероксидазного окисления аминобифенилов можно наблюдать на электрофореграмме, так как поперечные сшивки приводят к потере электрофоретической подвижности ДНК. Результаты электрофоретического анализа показали (рисунок 3), что с увеличением концентрации бензидаина в реакционной смеси наблюдается увеличение количества ДНК фага  $\lambda$  на старте электрофореграммы. Это свидетельствует о потере ее электрофоретической подвижности вследствие повреждения продуктами пероксидазного окисления бензидаина. Процесс образования сшивок ДНК начинался при концентрации бензидаина в реакционной среде  $0,2 \times 10^{-6}$  моль/л (рисунок 3Б, дорожка 9). Полная потеря электрофоретической подвижности ДНК в данных условиях наблюдалось при концентрации бензидаина равной  $1 \times 10^{-6}$  моль/л (рисунок 3Б, дорожка 13)

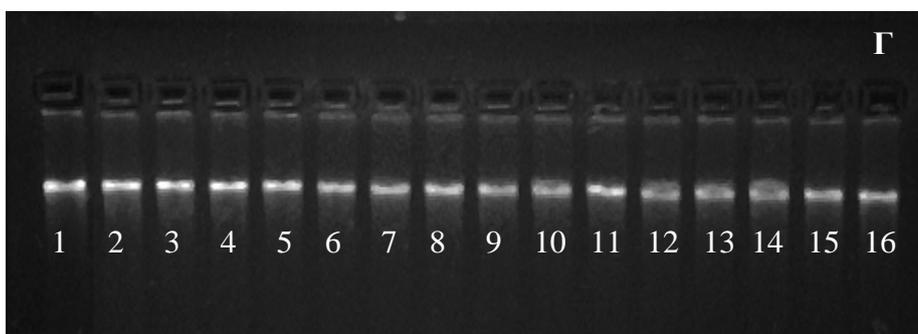
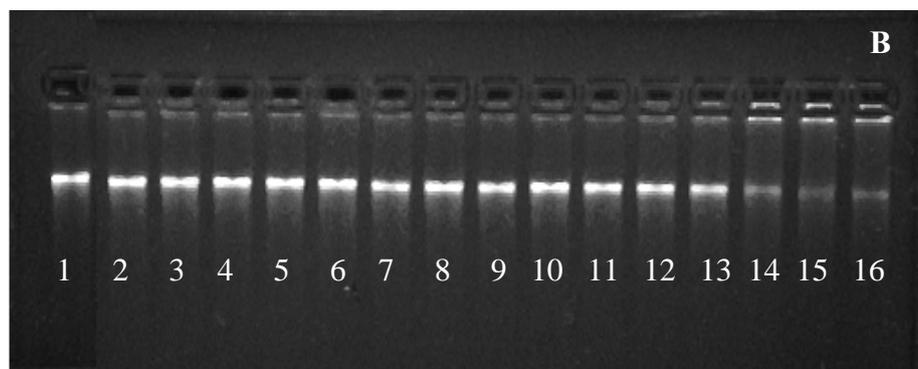
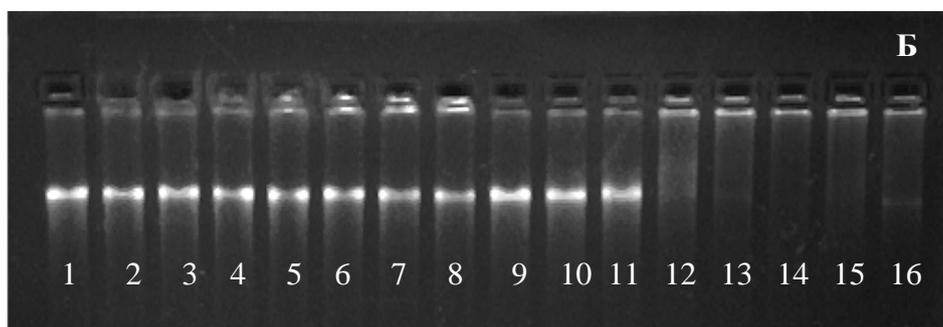
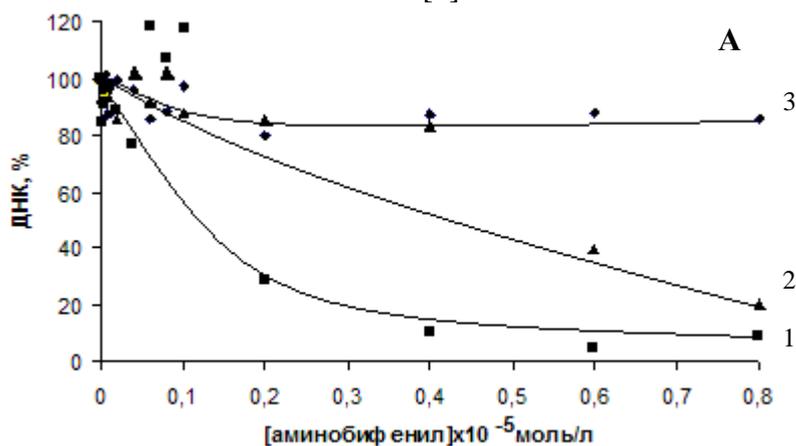


Дорожки: 1 – нативная ДНК, 2-14 – реакционная смесь, содержащая 0,1 моль/л Трис-НСI буфер (рН 7,4) с добавлением 0,05% Твин 20, ДНК фага  $\lambda$  (0,5 мкг), пероксидазу хрена ( $1 \times 10^{-7}$  моль/л), перекись водорода (1 ммоль/л), различные концентрации бензидаина ( $0,2 \times 10^{-7}$  моль/л –  $0,2 \times 10^{-5}$  моль/л).

Рисунок 3 – Зависимость степени повреждения нативной ДНК фага  $\lambda$  от концентрации бензидаина (А) и электрофореграмма ДНК фага  $\lambda$  в присутствии бензидаина (Б).

При изучении степени повреждения ДНК фага  $\lambda$  метильными и метоксильными производными бензидаина было показано, что наибольшей активностью в ряду бензидин (рисунок 3Б), 3,3'-диметоксибензидин (рисунок 4Б), 3,3'-диметилбензидин (рисунок 4А), и 3,5,3',5' – тетраметилбензидин (рисунок 4В) обладает бензидин. При увеличении количества метильных и метоксильных заместителей в молекуле аминобифенила их способность модифицировать ДНК уменьшается.

Известно, что флаволигнаны из семян расторопши пятнистой обладают широким спектром биологической активности [8].



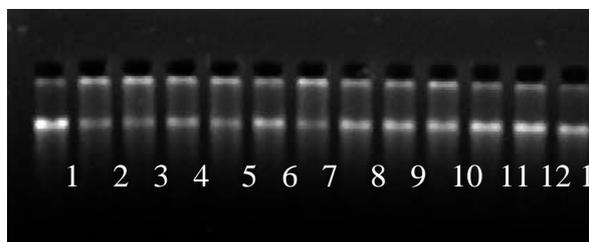
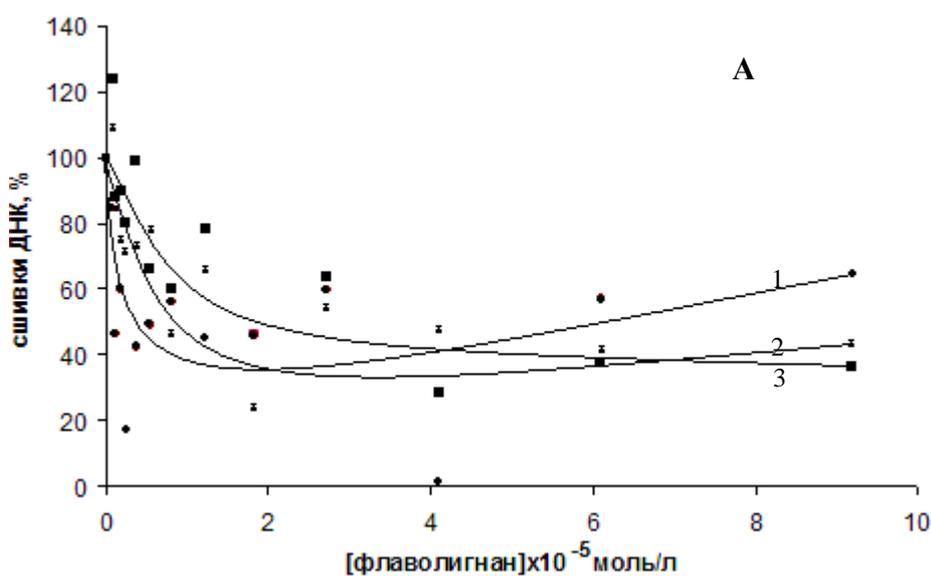
А – 1 – 3,3-диметилбензидин, 2 – 3,3'-диметоксибензидин; 3 – 3,5,3',5'-тетраметилбензидин.

Б-Г: Дорожки: 1 – нативная ДНК, 2-16 – реакционная смесь, содержащая 0,1 моль/л Трис-НСI буфер (рН 7,4) с добавлением 0,05% Твин 20, ДНК фага λ (0,5 мкг), пероксидазу хрена ( $1 \times 10^{-7}$  моль/л), перекись водорода (1 ммоль/л), различные концентрации аминобифенилов (3,3-диметилбензидин (Б), 3,3'-диметоксибензидин (В) и 3,5,3',5'-тетраметилбензидин (Г)) ( $0,2 \times 10^{-7}$  моль/л –  $0,6 \times 10^{-5}$  моль/л).

Рисунок 4 – Зависимость степени повреждения нативной ДНК фага  $\lambda$  от концентрации аминоксифенилов (А) и электрофореграммы ДНК фага  $\lambda$  в присутствии различных концентраций аминоксифенилов (Б).

Нами была исследована возможность силимарина и отдельных флаволигнанов: силибина, силикрестина и силидианина, а также флавоноида таксифолина влиять на образование перекрестных сшивок ДНК фага  $\lambda$  продуктами пероксидазного окисления бензидина. Возможный механизм ингибирования заключается во взаимодействии флавоноидов с радикальными продуктами окисления бензидина и предотвращении повреждений ДНК и сохранения ее нативной структуры. На рисунке 5 представлены результаты влияния различных концентраций силимарина на процесс образования перекрестных сшивок ДНК фага  $\lambda$ . Как видно из рисунка 5, при внесении в реакционную среду различных концентраций силимарина наблюдается постепенное появление неповрежденной ДНК фага  $\lambda$  (дорожки 3-13).

Было выявлено, что силимарин в концентрациях 0,48 моль/л начинает проявлять антирадикальную активность, предотвращая образование межнитевых сшивок ДНК фага  $\lambda$ . На рисунке 5А показана зависимость образующихся поперечных сшивок ДНК в присутствии различных концентраций силимарина, силикрестина и таксифолина. Исследованные флаволигнаны: силидианин и силибин, также как и силимарин предотвращали образование структурных изменений ДНК, что свидетельствует об их способности эффективно взаимодействовать с радикальными продуктами пероксидазного окисления бензидина.



А – 1 – силикрестин, 2 – таксифолин, 3 – силимарин.

Б - Дорожки: 1 – нативная ДНК, 2 – реакционная смесь, содержащая 0,1 моль/л Трис-НСI буфер (рН 7,4) с добавлением 0,05% Твин 20, ДНК фага  $\lambda$  (0,5 мкг), пероксидазу хрена ( $1 \times 10^{-7}$  моль/л), перекись водорода (1 ммоль/л), бензидин ( $0,2 \times 10^{-5}$  моль/л), 3-13 – реакционная смесь, содержащая 0,1 моль/л Трис-НСI буфер (рН 7,4) с добавлением 0,05% Твин 20, ДНК фага  $\lambda$  (0,5 мкг), пероксидазу хрена ( $1 \times 10^{-7}$  моль/л), перекись водорода (1 ммоль/л), бензидин ( $0,2 \times 10^{-5}$  моль/л) и различные концентрации ( $0,14 \times 10^{-6}$  моль/л –  $8,2 \times 10^{-6}$  моль/л).

Рисунок 5 – Влияние индивидуальных флаволигнанов и таксифолина на процесс образования аддуктов ДНК-ароматический амин при пероксидазном окислении бензидина (А), и накопление агрегированной бензидином ДНК фага  $\lambda$  на старте в зависимости от концентрации в реакционной среде силимарина (Б).

В результате исследований было показано, что флаволигнаны из семян расторопши пятнистой способны предотвращать образование перекрестных сшивок ДНК фага  $\lambda$ . Увеличение концентрации флаволигнанов в реакционной среде от 0,14 моль/л до 8,2 моль/л ведет к постепенному уменьшению агрегированной ДНК на старте, что свидетельствует о восстановлении электрофоретической подвижности этой макромолекулы и сохранению ее нативной структуры.

Установлено, что концентрация исследуемых веществ, необходимая для 50% снижения повреждающего действия продуктов пероксидазного окисления бензидина ( $0,2 \times 10^{-5}$  моль/л) составила: для силикрестина –  $0,54 \times 10^{-5}$  моль/л, для таксифолина –  $1,17 \times 10^{-5}$ , для силимарина –  $1,891 \times 10^{-5}$  моль/л, для силибина –  $4,1 \times 10^{-5}$  моль/л и для силидианина –  $14,98 \times 10^{-5}$  моль/л. Таким образом, силикрестин является наиболее эффективным ингибитором повреждения ДНК фага  $\lambda$  продуктами перекисного окисления бензидина, являясь лучшим генопротектором среди исследованных флаволигнанов.

### **Выводы**

Взаимодействие радикальных промежуточных продуктов пероксидазного окисления бензидина с ДНК, вызывающие перекрестные сшивки ДНК-ДНК может быть предотвращено флаволигнанами из семян расторопши пятнистой, обладающими антирадикальными свойствами. При этом эффективность генопротекторного действия убывает в ряду силикрестин – таксифолин – силимарин – силибин – силидианин. Обнаруженная генопротекторная активность силимарина и его компонентов существенно расширяет спектр специфических фармакологических активностей этой широко используемой лекарственной субстанции.

### **Список литературы**

1. Новиков, Д.А. Ингибирование эномеланином пероксидазного окисления бензидина / Д.А. Новиков, В.П. Курченко // Биологически активные вещества растений в медицине, сельском хозяйстве и других отраслях: материалы междунар. науч.-практ. конф. (Нарочанские чтения-2), Минск-Нарочь, 27-30 сентября 2006 г. / Бел. гос. ун-т; под общ. ред. В.Н. Решетникова. – Минск, 2006. – С. 146-158.
2. Metabolism of carcinogenic heterocyclic and aromatic amines by recombinant human cytochrome P450 enzymes / G.J. Hammons [et al.] // Carcinogenesis. – 1997. - Vol. 18, № 14. – P. 851-854.
3. Dhiman, R.K. Herbal medicines for liver diseases / R.K. Dhiman, Y.K. Chawla // Digestive diseases and sciences. – 2005 – Vol. 50, № 10. – P. 1807-1812.
4. Determination of silymarin in the extract from dried silybum marianum fruits by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis / M.G. Quaglia [et al.] // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 1999. - Vol. 19. – P. 435-442.
5. Milk thistle nomenclature: Why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies / D.J. Kroll [et al.] // Integr Cancer Ther. – 2007. - Vol. 6, № 2. – P. 110-119.
6. Мараховский Ю.Х. Клиническая оценка потенциальных возможностей и ограничений гепатопротекторов / Ю.Х. Мараховский // Рецепт. – 2005. - № 1, Вып. 39. – С. 42-50.
7. Питкевич, Э.С. Расторопша пятнистая – *Silybum marianum* (L.) / Э.С. Питкевич, А.Н. Лызиков, С.В. Цаприлова // Проблемы здоровья и экологии. – 2008. - № 4. – С. 119-126.

8. Corchete P. *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the source of silymarin / P. Corchete // Bioactive molecules and medicinal plants / K.G. Ramawat, J.M. Merillon. – Springer Berlin Heidelberg, 2008. – P. 123-148.
9. Цаприлова, С.В. Расторопша пятнистая: химический состав, стандартизация, применение / С.В. Цаприлова, Р.А. Родионова // Вестник фармации. – 2008. - № 3, Вып. 41. – С. 92-104.
10. Самигуллина, Л.И. Иммуотропные свойства препаратов расторопши пятнистой: автореф. дис. канд. мед. наук: 14.00.25 / Л.И. Самигуллина; Башк. гос. мед. ун-т. – Уфа, 2002. – 23с.
11. Получение биологически активных веществ из семян расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.)) / А.С. Щекатихина [и др.] // Труды БГУ. Серия «Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем». – 2008. – Т 3, Ч. 1. – С.202–209.
12. Новиков, Д.А. Влияние растительных меланинов на степень повреждения ДНК радикальными промежуточными продуктами пероксидазного окисления аминобифенилов бензидинового ряда / Д.А. Новиков, В.П. Курченко // Биохимия: сб. научн. ст. / Бел. гос. ун-т; авт.-сост. В.В. Сенчук [и др.] – Минск, 2005. – С. 94-99.
13. Новиков, Д.А. Молекулярные механизмы генотоксического действия канцерогенных аминобифенилов / Д.А. Новиков, В.П. Курченко, Н.В. Гавриленко // Биохимия: сб. научн. ст. / Бел. гос. ун-т; авт.-сост. В.В. Сенчук [и др.] – Минск, 2005. – С. 100-106.
14. Новиков Д.А. Биохимические свойства меланинов из винограда (*Vitis vinifera*) и черного чая (*Thea Sinensis*): дис. на соискание уч. степ. канд. биол. наук: 03.00.04 / Д.А. Новиков – Минск, 2002. – 21 л.