

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПОСЛЕ ВЫРАЩИВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ ДЕРМЫ ЧЕЛОВЕКА В ПРИСУТСТВИИ РУТИНА

Лукашов Р.И., Бутенко А.В., Гурина Н.С., Квачева З.Б., Полешико А.Г.

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Белоруссия

Актуальность. Рутин – один из самых распространенных флавоноидов в растительном мире, который проявляет широкий спектр фармакологических свойств, среди которых противовоспалительные, антиоксидантные, гипогликемические, капилляропротекторные, антиаллергические, противоопухолевые, протекторные при воздействии ультрафиолетового излучения, ДНКпротекторные, антиатеросклеротические свойства [1].

Многие из этих фармакологических эффектов связывают с высоким антиоксидантным статусом рутина, что способствует защите клеток от деструктивного влияния активных форм кислорода (АФК). Это реализуется несколькими основными путями: через прямое взаимодействие с АФК (восстановление), через хелатирование прооксидантных ионов металлов (например, ионов железа), ингибирование перекисного окисления липидов и др. [2]. Также следует отметить, что антиоксиданты в больших концентрациях могут проявлять и прооксидантное действие [3].

Учитывая перспективы применения рутина как протектора от повреждения ультрафиолетовым излучением [4] рационально рассмотреть его влияние на культуру фибробластов дермы человека, являющихся основными клетками кожи. При этом важным аспектом является изучение способности фибробластов поглощать из культуральной среды рутин для включения в свой клеточный метаболизм. Для оценки остаточного содержания данного вещества в культуральной жидкости были использованы ее антиоксидантные свойства. Можно предположить, что антиоксидантный потенциал культуральной жидкости свидетельствует не только о содержании в ней рутина, но и об ее возможном негативном прооксидантном действии на фибробласты

Цель исследования. Изучить антиоксидантные свойства культуральной жидкости при выдерживании рутина в разных концентрациях с фибробластами дермы человека *in vitro*.

Материалы и методы. Все клеточные эксперименты выполнены после фильтрования через фильтр с размерами пор 0,2 μ растворов рутина, полученных путем растворения в фосфатном буферном растворе (PBS) с pH 7,4 и добавление 2 % диметилсульфоксида (ДМСО), с целью обеспечения микробиологической чистоты. В качестве объекта исследования использовали образцы культуральной жидкости после выдерживания фибробластов дермы человека в течение 24 ч на поддерживающей среде (модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM) с добавлением 2 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС)), в которую внесли растворы рутина, создающие следующие концентрации рутина в культуральной среде: 400, 200, 100, 15, 7,5, 5, 3, 1,5 и 1 мкмоль/л (мкМ). В работе стандарт рутина использовали производства Sigma-Aldrich.

В экспериментах использовали односуточную культуру фибробластов кожи человека 3-7 пассажа с 80% сформированным монослоем в стадии логарифмического роста, выращенную на покровных стеклах во флаконах. В качестве ростовой среды использовали DMEM с добавлением 10 % ЭТС и антибиотиков (пенициллин/стрептомицин). После смены среды на поддерживающую (DMEM и 2 % ЭТС) вносили раствор рутина в PBS в исследуемых концентрациях. В контрольные культуры после смены среды вместо рутина вносили PBS. Учет результатов проводили через 24 ч.

Также оценивали АОА культуральной жидкости, полученной в лечебной и профилактической моделях для рутина в концентрациях 10, 100 мкМ и в профилактической модели в концентрациях 0,1, 1 мкМ. Профилактическая схема заключалась в том, что рутин вносили на 24 ч, затем вызывали окислительный стресс добавлением пероксида водорода на 3 ч; лечебная схема – вносили к клеткам пероксид водорода на 3 ч и затем вносили рутин на 24 ч.

Для приготовления испытуемого раствора использовали $0,400 \pm 0,001$ мл культуральной жидкости и прибавляли $2,80 \pm 0,01$ мл 0,01% спиртового раствора 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила с учетом относительности метода. Измерение проводили через 30 мин после смешивания. Компенсационный раствор получали смешением $0,400 \pm 0,001$ мл культуральной жидкости и $2,80 \pm 0,01$ мл 96% спирта.

Контрольный раствор готовили аналогично испытуемому с использованием культуральной жидкости контрольной культуры, инкубация которой осуществлялась без рутина.

Все измерения проводили трижды на спектрофотометре Solar серии РВ 2201 при длине волны 517 нм. Обработку результатов осуществляли при помощи компьютерной программы «Microsoft Office Excel 2015», пакет «Анализ данных». Результаты приведены в виде среднего значения \pm полуширина доверительного интервала ($p \leq 0,05$).

Результаты. В диапазоне концентраций рутина в культуральной жидкости от 5 до 400 мкМ процент поглощения радикалов плавно возрастал от 6,2 % ($p = 0,10$) до 24,2 % ($p = 0,024$) ($r = 0,9765$; $y = 3,1305x + 1,96$). При этом в диапазоне концентраций от 1 до 3 мкМ АОА изменяется стохастически, уходя в область отрицательных значений.

В профилактической и лечебной моделях АОА рутина составила от -10,2 % до -0,6 % (с учетом относительности метода от 0,6 % до 3,8 %), что статистически значимо не отличалось от контроля ($p = 0,35$ и $0,29$ соответственно). АОА рутина в концентрациях 0,1 и 1 мкМ не отличалась от контроля ($p = 0,39$).

Наличие отрицательных значений указывает на то, что исходные компоненты культуральной жидкости (например, ароматические аминокислоты) сами по себе проявляют антиоксидантные свойства.

В профилактической модели рутин в концентрациях 10 и 100 мкМ и пероксид водорода сопоставим по концентрации ТБК(тиобарбитуровая кислота)-активных

продуктов с только пероксидом водорода ($p = 0,075$) и больше только ДМСО на 25,0 % (отн.) ($p = 0,013$) и 16,2 % (отн.) ($p = 0,044$) соответственно, что говорит о синергизме окисления, вызванного ДМСО и рутином.

В лечебной модели рутин в обеих концентрациях снижал концентрацию ТБК-активных продуктов на 22,6 % (отн.) ($p = 0,045$) и 16,3 % (отн.) ($p = 0,054$) соответственно по сравнению с только пероксидом водорода. При этом снижение происходит до уровня ДМСО, что указывает на антиоксидантный эффект рутина.

В лечебной модели на культуральной жидкости рутин значимо снижал концентрации ТБК-активных продуктов по сравнению с контролем, что говорит об антиоксидантном действии. В профилактической модели – повышал данный показатель по сравнению с контролем, что говорит о синергизме действия с ДМСО и/или окислителем.

Выводы. В диапазоне концентраций рутина от 5 до 400 мкм в культуральной жидкости процент поглощения радикалов плавно возрастал. В профилактической и лечебной моделях антиоксидантная активность рутина значимо не отличались от контроля.

В лечебной модели на культуральной жидкости рутин значимо снижал концентрации ТБК-активных продуктов по сравнению с контролем, что говорит об антиоксидантном действии. В профилактической модели – повышал данный показатель по сравнению с контролем, что говорит о синергизме действия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang, T. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate / T. Wang, Q. Li, K. Bi // Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2018. – Vol. 13, Iss. 1. – P. 12-23.
2. Механизмы фармакологического действия рутина (обзор). / И. В. Ковальский [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2014. – Т. 48, № 2. – С. 3-6.
3. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview / J. Teixeira [et al.] // Biomed Res Int. – 2013 [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23956973/>. – Дата доступа : 15.11.2024.
4. SPF enhancement provided by rutin in a multifunctional sunscreen / L. C. Tomazelli [et al.] // Int. J. Pharm. – 2018. – Vol. 1. – P. 401-406.

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«Курский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

(ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России)



ФАРМАКОЛОГИЯ И ФАРМАЦЕВТИКА: ОТ ИДЕИ ДО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Сборник научных трудов по материалам Всероссийской научно-практической конференции с международным участием



29 ноября 2024 г., Курск