
НЕКОТОРЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ

И.А. Николаева, М.Ф. Минеева, В.К. Колхир

Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР)
ул. Грина, 7, Москва, Россия, 117216
тел. +79114636467, эл. почта: somvoz@live.ru

Впервые в одном исследовании изучали ряд тритерпеновых гликозидов (ТГ), отличающихся между собой строением генина — тритерпена и/или строением углеводной части. Оценивали непосредственное влияние изучаемых ТГ на ферменты: глутатионредуктазу (ГР), каталазу (КАТ) и НАДФН-оксидазу, играющие регуляторную роль в процессах адаптации. Установлено впервые, что ТГ различного строения оказывают непосредственное, неодинаковое влияние на скорость ГР, КАТ и НАДФН-оксидазной реакций, различаясь по знаку и выраженности проявляемого эффекта.

Ключевые слова: тритерпеновые гликозиды, ферментные биотест-системы.

Тритерпеновые гликозиды (ТГ) являются низкомолекулярными биорегуляторами и обладают широким спектром их фармакологических свойств, в том числе с адаптогенной активностью [1]. За последние 30 лет достигнуты значительные успехи в установлении их полной структуры, фармакологического эффекта, однако молекулярные механизмы действия ТГ изучены недостаточно. Вместе с тем выяснение молекулярных механизмов действия ТГ актуально как в теоретическом, так и в практическом отношении.

Объектами исследования были патринозид-Д из патринии гладкой, эсцин из каштана конского, биколорозиды-А и -В из качима двуцветного, календулозид из календулы лекарственной, глицерам из солодки голой, тритерпеновые гликозиды корня женьшеня. Изучали непосредственное влияние выбранных веществ на ферменты глутатионредуктазу (ГР), каталазу (КАТ) и НАДФН-оксидазу. Ранее было показано [2], что соединения адаптогенной направленности избирательно повышают скорость ГР реакции и снижают скорость КАТ реакции *in vitro*. Актопротекторы, частный случай адаптогенов, повышают скорость ГР реакции, практически не влияя на скорость КАТ реакции. Активаторы фагоцитоза и активаторы гуморального иммунитета обладают сродством к НАДФН-оксидазе и активируют ее при непосредственном контакте *in vitro* [3]. Это позволяет выявить не только наличие иммуномодулирующей активности, но и принадлежность соединений к гуморальным иммуноактиваторам или к активаторам клеточного иммунитета [4].

Материалы и методы. НАДФН, глутатион окисленный, а также высокоочищенные ферменты глутатионредуктаза, каталаза — реактивы фирмы Сигма, США. Источником НАДФН-оксидазы служили спокойные лейкоциты из лейкоцитарной массы крови собаки. Скорость ферментативных реакций измеряли спектрофотометрически на спектрофотометре Clima-15, Италия; скорость глутатионредуктаз-

ной реакции — по [5], скорость каталазной реакции — по [6], скорость НАДФН-оксидазной реакции — по [7]. ТГ добавляли в пробы после внесения ферментов, в интервале концентраций 1,5—50 мкг/мл пробы.

Результаты и обсуждения. На рис. 1 представлено влияние *in vitro* ТГ на скорость НАДФН-оксидазной реакции в гомогенате спокойных полиморфноядерных лейкоцитов. Предварительно были определены скорости ферментных реакций в присутствии ТГ в широком диапазоне концентраций: 1,5—50 мкг/мл. Было установлено, что зависимость величины эффекта *in vitro* от концентрации ТГ описывается кривой с максимумом. Все результаты приведены для оптимальных концентраций каждого ТГ в пробе.

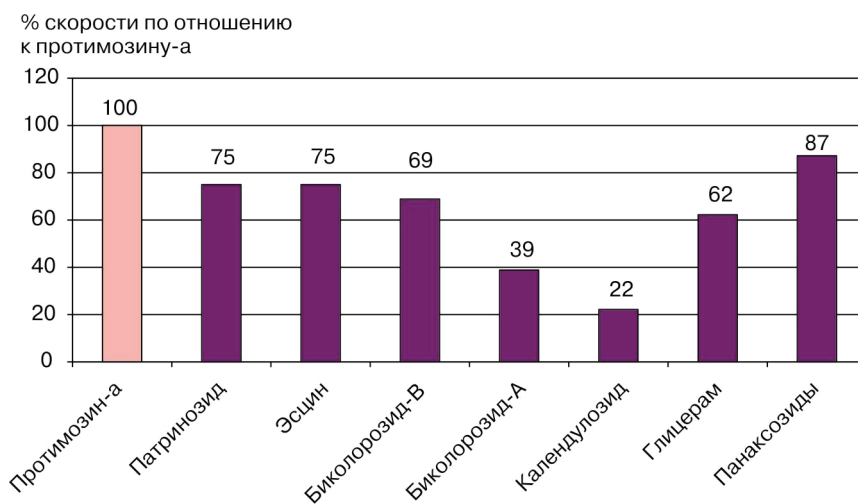


Рис. 1. Влияние ряда тритерпеновых гликозидов на скорость НАДФН-оксидазной реакции в гомогенате спокойных полиморфноядерных лейкоцитов в условиях *in vitro*

В связи с тем, что в спокойных лейкоцитах НАДФН-оксидаза не активна, для сравнительной оценки непосредственного активирующего влияния изучаемых ТГ на НАДФН-оксидазу скорость реакции, измеренную в присутствии изучаемых объектов, соотносили со скоростью НАДФН-оксидазной реакции в присутствии известного природного иммуоактиватора протимозина- α , принимая ее за 100%. Концентрация препарата сравнения — протимозина- α составляла 1 мкг/мл пробы. Скорость ферментативной реакции в присутствии протимозина- α составляла 26,7 мкмоль/мин на 10 мкл гомогената лейкоцитов.

Как видно из рис. 1, все исследуемые ТГ оказывают активирующее влияние на НАДФН-оксидазу. Максимальный эффект проявляют ТГ женьшеня, активируя фермент на 87% по сравнению с протимозином- α . Эффекты патринозида и эсцина оказались близки между собой и сравнимы с эффектом биколорозида-В. Биколорозид-А и календулозид проявили очень слабое активирующее действие. По величине непосредственного активирующего действия на НАДФН-оксидазу (в % от скорости реакции в присутствии протимозина- α) изучаемые образцы располагаются в следующий ряд: протимозин- α > панаксозиды > патринозид \approx эсцин > биколорозид-В > глицерам > биколорозид-А > календулозид.

В табл. 1 представлены кинетические параметры НАДФ-Н-оксидазной реакции при добавлении ТГ к гомогенату спокойных полиморфноядерных лейкоцитов. Для сравнения были взяты: известный природный активатор гуморального иммунитета протимозин- α и активатор терминальной стадии фагоцитоза метилурацил.

Таблица 1

Кинетические параметры НАДФ-Н-оксидазной реакции при добавлении ТГ к гомогенату спокойных полиморфноядерных лейкоцитов

Тритерпеновый гликозид	Скорость реакции, мкмоль/мин. на 10 мкл гом.		Кинетические параметры НАДФ-Н-оксидазной реакции	
	контроль	опыт	Km НАДФ-Н, мкМ	Vmax, нмоль/мин на 10 мкл гом
Протимозин- α	0	26,7	0,02	30,0
Метилурацил	0	0,26	0,24	34,0
Патринозид	0	20,0	0,15	15,2
Эсцин	0	20,0	0,10	20,0
Биколорозид-А	0	10,4	0,10	22,0
Биколорозид-В	0	18,4	0,06	30,0
Календулозид	0	5,9	0,62	34,0
Глицерам	0	23,2	0,27	23,4

Из таблицы видно, что в контрольной пробе скорость НАДФН-оксидазной реакции равна 0. При добавлении в пробу, к гомогенату спокойных лейкоцитов, протимозина- α , НАДФН окисляется со скоростью 26,7 мкмоль/мин на 10 мкл гомогената клеток. При добавлении метилурацила НАДФН-оксидаза также активируется. При этом НАДФН окисляется со скоростью 0,26 мкмоль/мин на 10 мкл гомогената клеток. Было показано, что активирующее действие биколорозида-В было по своей величине ближе к эффекту протимозина- α . Глицерам проявляет свойства, схожие с метилурацилом. Остальные ТГ, в том числе и панаксозиды, проявили себя как активаторы смешанного иммунитета. Таким образом, в НАДФН-оксидажном тесте *in vitro* проявляются свойства ТГ как химической группы соединений.

Результаты изучения непосредственного влияния ТГ на ГР и КАТ *in vitro* представлены на рис. 2.

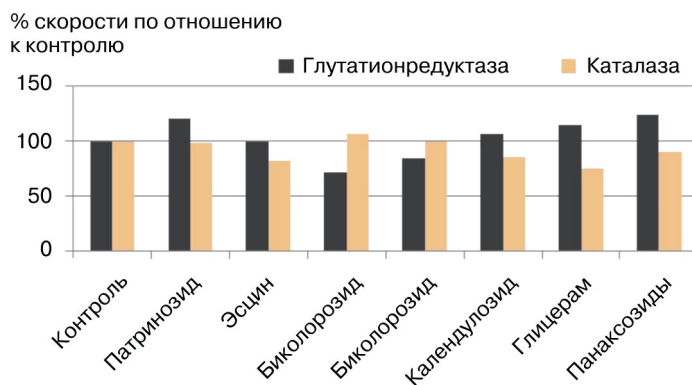


Рис. 2. Влияние тритерпеновых гликозидов на скорость глутатионредуктазной и каталазной реакции в условиях *in vitro*

На рис. 2 видно, что патринозид, календулозид, панаксозиды и глицерам оказывают активирующее влияние на ГР, что свидетельствует наличии в их структуре близких по строению элементов, обеспечивающих взаимодействие с этим ферментом и последующую его активацию; биколорозид-А и -В угнетают ее. Наиболее выраженный эффект активации проявляют панаксозиды и патринозид. При этом эсцин не оказывает влияния на скорость глутатионредуктазной реакции. Активирующие ГР панаксозиды оказывают угнетающее действие на каталазу, а патринозид не влияет. Глицерам, календулозид и эсцин также ингибируют действие фермента. При этом заметнее всего угнетающий эффект проявил глицерам. Это свидетельствует о сходстве элементов структуры в молекуле ТГ, обеспечивающих взаимодействие с каталазой, приводящее к ее торможению. По ингибирующему действию на каталазу образцы расположились в следующий ряд: биколорозид-А > патринозид > панаксозиды > календулозид > эсцин > глицерам. Биколорозид-В проявляет слабые антиоксидантные свойства, ускоряя на 6% каталазную реакцию.

Таким образом, впервые установлено, что тритерпеновые гликозиды различного строения оказывают непосредственное, неодинаковое влияние на скорость ГР, КАТ и НАДФН-оксидазной реакции, различаясь по знаку и выраженности проявляемого эффекта, что отражается в различиях спектров их фармакологического действия.

Выводы.

1. С использованием специфических ферментных биотест-систем *in vitro* — глутатионредуктазной, каталазной и НАДФН-оксидазной — были выявлены сходства и различия в молекулярных механизмах действия ТГ из растений семейств Аралиевых, Гвоздичных, Валериановых и Конскокаштановых.

2. Тритерпеновые гликозиды (панаксозиды, патринозид, глицерам и календулозид) непосредственно активируют ГР и угнетают КАТ. В то же время биколорозиды-А и -В угнетают ГР, при этом биколорозид-А не влияет на КАТ, а биколорозид-В активирует ее.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Попов А.М. Механизмы биологической активности гликозидов женьшеня: сравнение с гликозидами голотурий // Вестник ДВО РАН. — 2006. — № 6. — С. 92—104.
- [2] Быков В.А., Минеева М.Ф., Дубинская В.А. и др. Способ выявления веществ, обладающих адаптогенными свойствами, *in vitro* // Патент РФ № 2181890. — 2001. — С.А. 137:379958. — 2003.
- [3] Быков В.А., Минеева М.Ф., Попова Н.Б. Способ выявления веществ с потенциальной иммуномодулирующей активностью, *in vitro* с применением НАДФН-оксидазной тест-системы // Патент № 2194077. — 2002. С.А 138: 297591. — 2004.
- [4] Лукашина Т.В., Минеева М.Ф., Дубинская Л.Б. и др. Использование специфических ферментных тест-систем *in vitro* для разработки многокомпонентного препарата Стабинорм // Вопросы биол., мед. и фармац. химии. — 2008. — № 1. — С. 1—56.
- [5] Корольюк М.А., Иванова М.И., Майорова И.Г. и др. // Лаб. Дело. — 1988. — № 1. — С. 1—8.
- [6] Daniels R.H., Elmore M.A., Hill M.E. et al. // Immunology. — 1994. — N 3. — P. 465.
- [7] Aebi H. Glutathione reductase // Methods in enzymatic analysis. — 1974. — V. 2. — P. 673—678.

**SOME APPROACHES TO RESEARCH
OF MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION
THREE-TERPENS GLYCOSIDE**

**I.A. Nikolaeva, M.F. Mineeva,
V.K. Kolhir**

All-Russian Institute of Medicinal Plants (VILAR)
Green's str., 7, Moscow, Russia, 117216
tel. +79114636467, email: somvoz@live.ru

For the first time in one research were studied three-terpens glycoside (TG), different among themselves a structure of genin-three-terpen and-or a structure of a carbohydrate part. Direct influence studied TG on enzymes glutationreductase (GR), catalase (CAT) and NADFH-oxidase, playing a regulatory role in adaptation processes was defined. It is established for the first time that TG a various structure make direct, unequal impact on speed reactions of GR, CAT and NADFH-oxidase, differing on a sign and expressiveness of shown effect.

Key words: three-terpens glycoside, enzymatic biotests-systems.