

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА С МЕТИОНИНОМ И ЭКСТРАКТОМ КУРКУМЫ *IN VITRO*

© 2018 г. О. А. Гизингер, Е. В. Симонян, А. В. Хисамова

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Челябинск, Россия

Поступила: 12.05.2018. Принята: 17.06.2018

Проведен анализ наличия у композиции из метионина и куркумы антиоксидантных и дополнительных иммуностимулирующих свойств в условиях *in vitro*. Определение активности каталазы в отношении метионина, куркумы, композиции из куркумы и метионина проводили на модели нейтрофильных гранулоцитов периферической крови доноров по реакции с аммония молибдатом, функционально-метаболический статус нейтрофильных гранулоцитов изучен по показателям активности и интенсивности фагоцитоза, активности и интенсивности нейтрофильных гранулоцитов в НСТ-тесте. Показано, что совместная инкубация нейтрофильных гранулоцитов крови здоровых доноров с раствором куркумы и композицией из куркумы и метионина обладает высокой антиоксидантной активностью, приводит к усилению спонтанной и индуцированной НСТ-редуцирующей активности, увеличению функционального резерва и фагоцитарного потенциала данных клеток.

Ключевые слова: метионин, экстракт куркумы, нейтрофильные гранулоциты

DOI: 10.31857/S102872210002388-1

Адрес: 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64, ФГБОУ ВО ЮУГМУ Минздрава России, Гизингер Оксана Анатольевна. Тел.: +89193194604, E-mail: Ogizinger@gmail.com

Авторы:

Гизингер О. А., д. б. н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия;

Симонян Е. В., к. м. н., зав. кафедрой фармакологии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Челябинск, Россия;

Хисамова А. В., медицинский представитель по Челябинской области Abbott Laboratories, Москва, Россия.

ВЕДЕНИЕ

Создание препаратов на основе метионина и растительных экстрактов, обладающих антиоксидантными свойствами, является одной из задач, решение которой является направлением современной фармакологии [1]. Не менее важной проблемой является исследование иммуностимулирующих возможностей композиций с антиоксидантными эффектами в отношении клеток-эффекторов иммунной систе-

мы. На сегодняшний день фармацевтическая промышленность представляет композиции из агентов с высокой степенью биодоступности из метионина и биологически активных компонентов, полученных из растительного сырья. Одним из таких веществ является куркумин, биологически активный компонент растения *Curcuma longa L.*, семейство имбирные – *Zingiberaceae*. Куркумин угнетает экспрессию генов фактора некроза опухоли альфа и индуцибельной циклооксигеназы, действует как антиоксидант и модулятор пролиферации и апоптотической активности фагоцитов и лимфоцитов [2]. Выбор качественного и количественного состава лекарственной формы на основе метионина и экстракта куркумы должен базироваться на анализе совместной биологической активности входящих в состав агентов и их участия в реализации протективных механизмов антимикробной защиты макроорганизма. Антиоксидантная активность композиции на основе метионина и экстракта куркумы в отношении нейтрофильных гранулоцитов мало изучена. Ранее, экспериментально доказано, что экс-

тракт куркумы и метионин проявляют антиоксидантные эффекты в отношении гепатоцитов и лимфоцитов, при этом не выявляя прооксидантного эффекта [3]. Это дает основание думать, что комбинация из метионина и экстракта куркумы, также будет обладать выраженным антиоксидантным эффектом и оказывать стимулирующее воздействие на функции фагоцитирующих клеток, усиливающегося за счет синергизма двух действующих веществ (метионина и экстракта куркумы) [4]. Таким образом, получение новой информации в отношении метаболических закономерностей иммунного ответа в отношении композиции из экстракта куркумы и метионина откроет перспективы для ее использования и создания на основе данной композиции перспективного иммуностимулятора с антиоксидантными свойствами.

Цель исследования — анализ наличия у композиции из метионина и куркумы антиоксидантных и дополнительных иммуностимулирующих свойств в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования использована клеточная взвесь нейтрофильных гранулоцитов (НГ), выделенных из периферической крови здоровых доноров. Для выделения НГ периферической крови был использован двойной градиент фиколл-урографин $c = 1,077 \text{ г/см}^3$ и $c = 1,119 \text{ г/см}^3$. Гепаринизированную кровь здоровых доноров наслаивали на двойной градиент фиколл-урографина, затем центрифугировали 45 мин при 3000 об/мин, после получения двух колец верхнее из мононуклеарных клеток удаляли, нижнее из нейтрофильных гранулоцитов. После удаления кольца из мононуклеарных клеток, кольцо, содержащее нейтрофильные гранулоциты переносили в сухую чистую пробирку с питательной средой Хенкса, 37°C. Нейтрофильные гранулоциты дважды отмывали путем центрифугирования 10 мин при 1500 об/мин. Количество нейтрофильных гранулоцитов в клеточной суспензии подсчитывали в счетной камере Горяева с использованием прижизненной окраски раствором трипанового синего в 3% уксусной кислоте [5]. Для достижения концентрации $5 \cdot 10^6$ нейтрофильных гранулоцитов/мл клеточную суспензию разводили раствором Хенкса. Из 48 проб нейтрофильных гранулоцитов были сформированы 4 группы. 1 группа — интактные нейтрофильные гранулоциты (12 проб по 100 мкл), 2 группа — нейтрофиль-

ные гранулоциты + 0,01% раствор метионина (12 проб по 100 мкл), 3 группа — нейтрофильные гранулоциты + 0,029% раствор куркумы (12 проб по 100 мкл), 4 группа — нейтрофильные гранулоциты + композиция метионина и куркумы (12 проб по 100 мкл). Для получения композиции из метионина и куркумы смешивали 0,1 г метионина (ООО Фармстандарт) и 2,9 гр. спиртового экстракта куркумы. Для приготовления экстракта куркумы навеску 10,00 г высушенных и измельченных частей растения *Curcuma longa L* помещали в круглодонную колбу и добавляли 100 мл 70%-ного этилового спирта, кипятили в колбе с обратным холодильником на водяной бане в течение 15 мин, настаивали в течение 45 мин, процеживали и снова центрифугировали при 3000 об/мин. Полученный экстракт разбавляли 70%-ым этиловым спиртом до 100 мл. Для оценки высвобождения активных действующих веществ использовали спектрофотометрический метод по реакции с раствором нингидрина (для метионина) [4], а также по реакции образования розоцианина (для экстракта куркумы). Определение активности каталазы в отношении метионина, куркумы, композиции из куркумы и метионина проводили на модели нейтрофильных гранулоцитов периферической крови по реакции с молибдатом аммония. Для этого в опытную пробирку вносили 2 мл 0,03% раствора перекиси водорода, 100 мкл выделенной из периферической крови доноров суспензии нейтрофильных гранулоцитов, выделенных из периферической крови и 10% раствор испытуемого вещества. в количестве 100 мкл. В контрольную пробирку в качестве холостой пробы прибавляли 100 мкл дистиллированной воды. В контрольный раствор вносили 2,1 мл дистиллированной воды и 100 мкл суспензии нейтрофильных гранулоцитов. В качестве холостой пробы использовали раствор, состоящий из 2 мл 0,03% раствора пероксида водорода и 0,2 мл дистиллированной воды. Подготовленные таким образом растворы 10 минут инкубировали при 37°C, а затем, в каждую пробирку вносили 1 мл 4% раствора молибдата аммония. Интенсивность окраски была оценена спектрофотометрическим методом при 410 нм. Определение активности каталазы проводили для водного раствора метионина, спиртового экстракта куркумы и композиции из куркумы и метионина С помощью иммерсионной микроскопии учитывали активность фагоцитоза — % клеток, захвативших хотя бы одну частицу латекса, интенсивность фагоцитоза — число погло-

ценных микросфер латекса в 100 подсчитанных клетках. Кислородзависимый метаболизм был изучен в реакции восстановления нитросинего тетразолия [6]. Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета программ Statistica 10.0. Для определения достоверности различий в исследуемых группах применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сочетание метионина и экстракта куркумы в фармацевтической композиции оказывают выраженный антиоксидантный эффект по сравнению с монокомпонентами композиции: из метионина и экстракта куркумы. Реакции свободнорадикального окисления инициируются активными формами кислорода, приводящими к химической модификации и разрушению биомолекул. Благодаря наличию в организме сложных ферментных систем со специфическими электронтранспортными простетическими и коферментными группировками процесс восстановления кислорода протекает по многоступенчатому механизму, что минимизирует возможность образования высокорекреационных промежуточных соединений кислорода. В условиях как оксидативного стресса так и усиленного образования активных форм кислорода могут происходить процессы нарушения функционирования ферментов антиоксидантной системы [7]. Одним из таких ферментов антиоксидантной системы является каталаза, по динамике изменения показателей которой можно судить по антиоксидантной активности смеси. Активность каталазы в интактных нейтрофильных гранулоцитах составила $0,7758 \pm 0,028$ мкат/л, в присутствии водного раствора метионина активность каталазы составила $0,8052 \pm 0,049$ мкат/л, в присутствии экстракта куркумы активность каталазы нейтрофильных гранулоцитов составила $0,8227 \pm 0,035$ мкат/л, активность каталазы нейтрофильных гранулоцитов в присутствии композиции из метионина и экстракта куркумы составила $1,9335 \pm 0,017$ мкат/л. Нами предложен следующий механизм антиоксидантных эффектов заявляемой композиции, который состоит в том, что метионин представляя серосодержащую аминокислоту, выполняющую функцию донатора подвижных метильных групп для фосфолипидов, является необходимым компонентом для синтеза холина, недостаток которого приводит к нарушениям синтеза фосфолипидов клеточной стенки [8]. В состав куркумина

входят полифенолы, обладающие мощным антиоксидантным стимулирующим выработку нейтрофилами активных форм кислорода действием, а с другой стороны, полифенолы участвуют в нейтрализации свободных радикалов [9]. Комбинация метионина и куркумина обеспечивает потенцирование эффектов, что в клинической практике обеспечивает антиоксидантный и иммуностимулирующие эффекты в отношении нейтрофильных гранулоцитов. Нами не зарегистрированы изменения показателей кислородзависимого метаболизма в НСТ-тесте и активности и интенсивности в группе, где нейтрофильные гранулоциты были инкубированы только с метионином, $p > 0,05$. Зарегистрированы изменения показателей кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов в НСТ-тесте и фагоцитарной активности в группе, где нейтрофильные гранулоциты были инкубированы с экстрактом куркумы, $p < 0,05$. Наиболее значимые результаты были в группе, где использовалась композиция из куркумы и метионина, что подтверждает иммуностимулирующие эффекты данной композиции.

ОБСУЖДЕНИЕ

Совместная инкубация нейтрофильных гранулоцитов, выделенных из крови здоровых доноров с раствором куркумы и с композицией, состоящей из куркумы и метионина выявляет высокую антиоксидантную активность смеси, приводит к усилению спонтанной и индуцированной НСТ-редуцирующей активности, увеличению функционального резерва и фагоцитарного потенциала данных клеток. Возможный эффект связан с наличием в составе экстракта куркумы соединений, принадлежащих к структурным аналогам кумарина, производных полифенолоов, включая тиофенолы и аминокислоты [10], у которых обнаружены эффективные ингибиторы свободнорадикальных реакций, притекающих с участием Nox2-НАД(Ф)Н-оксидаз, обладающих доказанным иммуностимулирующим действием [11]. Установлено, что синергические комбинации куркумы и метионина способны обеспечивать достижение 2-кратного повышения антиоксидантного потенциала фагоцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Miller A. L. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases // *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*. 2003. 8. 1. . 7–19.

2. Aggarwal B. B., Sundaram C., Malani N., Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold in health and disease. *Advances in experimental medicine and biology*: Springer Publisher, 505. US, 2007. 1–75.
3. Yongjae Kim, Yanghee You, Ho-Geun Yoon, Yoo-Hyun Lee, Kyungmi Kim, Jeongmin Lee, Min Soo Kim, Jong-Choon Kim, Woojin Jun. Hepatoprotective effects of fermented *Curcuma longa* L. on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats., *Food Chemistry*, V. 151(15), 2014, 148–153
4. Shen S-Q., Zhang Y., Xiang J-J. *Et al.* Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World J. Gastroenterol.* 2007. 13, 13. 1953–1961.
5. Симомян А. В., Саламатов А. А., Покровская Ю. С., Аванесян А. А. Использование нингидриновой реакции для количественного определения α -аминокислот в различных объектах: Методические рекомендации. Волгоград., 2007. [Simonyan A. V., Salamatov A. A., Pokrovskaya Yu. S., Avanesyan A. A. The use of ninhydrin reaction for quantitative determination of α -amino acids in various objects: Methodical recommendations. Volgograd., 2007]
6. Гизингер О. А., Долгушин И. И., Ишпахтина К. Г., Маркова В. А. Изучение процесса формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек под воздействием лазера низкой интенсивности. *Мед. иммунология*. 2009. 11, 4–5. 406–407 [Gizinger O. A., Dolgushin I. I., Ishpakhtina K. G., Markova V. A. Study of the formation of neutrophil extracellular traps under the action of a low-intensity laser. *Med. immunology*. 2009. 11, 4–5. 406–407].
7. Гизингер О. А., Долгушин И. И., Действие низкоинтенсивного лазера на факторы местного иммунитета у женщин с хламидийной инфекцией. *Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физ. культуры*. 2006. 5. 20–23. [Gizinger O. A., Dolgushin I. I., Effect of a low-intensity laser on local immunity factors in women with chlamydial infection. *Vopr. balneology, physiotherapy and treatment. fiz. cult.* 2006. 5. 20–23].
8. Залесский В. Н., Великая Н. В. Куркумин и развитие статуса хронического вялотекущего воспалительного процесса при старении. *Пробл. харчування*. 2010. 3–4. 44–45. [Zallessky V. N., Velikaya N. V. Kurkumin and development of the status of chronic inflammatory process during aging. *Probl. food*. 2010. 3–4. 44–45.]
9. Shadyro O. Synthesis and study of antiviral and anti-radical properties of aminophenol derivatives *Bioorganik and Medicinal Chemistry Letters*. 2008. 18, 2420–2423
10. Бизунок Н. А., Дубовик В. В. Влияние адренергических средств на НАДФ-оксидазную продукцию активных форм кислорода в макрофагах. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008. 71, № 2. 43–46 [Bizunok N. A., Dubovik V. V. Effect of adrenergic agents on NADP oxidase production of reactive oxygen species in macrophages. *Experimental and clinical pharmacology*. 2008. 71, 2, 123–129].
11. Patra R. C., Swarup D., Dwivedi S. K. Antioxidant effects of α tocopherol, ascorbic acid and L-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology*. 2001. 162.

INVESTIGATION OF IMMUNOPHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF MEDICINAL MEDICINE WITH METHYONINE AND EXTRACT OF KURCUM *IN VITRO*

© 2018 O. A. Gizinger, E. V. Simonyan, A. V. Khisamova

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Received: 12.05.2018 Accepted: 17.06.2018

An analysis was made of the presence of antioxidant and additional immunostimulating properties in an *in vitro* composition from methionine and turmeric. Determination of catalase activity with respect to methionine, curcuma, curcuma and methionine composition was carried out on the model of neutrophilic granulocytes of peripheral blood of donors by reaction with ammonium molybdate, the functional-metabolic status of neutrophilic granulocytes was studied in terms of activity and intensity of phagocytosis, activity and intensity of neutrophilic granulocytes in NBT- test. It was shown that the joint incubation of neutrophilic granulocytes of blood from healthy donors with a solution of turmeric and a composition of turmeric and methionine has a high antioxidant activity

Key words: methionine, turmeric extract, neutrophilic granulocytes

Authors:

Gisinger O. A., ✉ Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, Federal State Unitary Enterprise of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia; 454092, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64, South Ural State Medical University. Phone: +89193194604, **E-mail:** Ogizinger@gmail.com;
Simonian E. V., MD, Phd, Head. Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Federal State Unitary Enterprise of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russia;
Khisamova A. V., medical representative of Chelyabinsk region Abbott Laboratories, Moscow, Russia.