

27. *A. Richard Ten Cate, P. Mark Bartold, Christopher A. Squier, Antonio Nanci.* Oral Histology. — Montreal. — 2003. — p. 445.
28. *Edward S. Cohen.* Atlas of cosmetic and reconstructive periodontal surgery. — Boston, Massachusetts. — 1994. — p. 9-30.
29. *Lee H. Silverstein.* Principles of dental suturing. — Atlanta. — 1999. — p. 80.
30. *Mike E. Tumbleson, Lawrence B. Schook.* Advances in swine biomedical research. — New York. — 1996. — p. 1-19.

Experimental modeling of surgical wound healing in oral cavity

K.A. Aksenov, M.B. Lomakin, G.D. Kapanadze, N.V. Smeshko

A problem of gingiva's healing insufficient prediction closely connected to sutures failure and becomes actual in operations based on guided tissue regeneration principles. The application of mini - pigs as biomodels for gingival healing features' studying and further extrapolation during reconstructive operations in oral cavity, permits carrying out histomorphological evaluation in all stages of wound healing process. The results received in experimental research, acknowledge the necessity of differentiated suturing method using in surgical practice.

Key words: Experimental biodesign with the use of svetlogorsky mini-pigs, adequacy of reproducing of cicatrisation of surgical wounds of cavity of mouth, directed tissue regeneration, method of the differentiated imposition of guy-sutures.

Влияние арбутина и гидрохинона на процессы свободно-радикального окисления в крови крыс

В.М. Брюханов¹, И.В. Смирнов¹, А.А. Бондарев¹, О.С. Талалаева¹,
В.М. Шабанова¹, Я.Ф.Зверев¹, В.В. Удут²

¹ — Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул

² — НИИ Фармакологии ТНЦ СО РАМН, Томск

Контактная информация: gc_ivan@mail.ru д.м.н., профессор Владимир Васильевич Удут

В экспериментах на крысах, а также методом квантово-химических расчетов было показано, что гидрохинон и арбутин обладают выраженной активностью в отношении процессов свободно-радикального окисления. Структурные отличия обеспечивают веществам разный характер этого действия. Было установлено, что гидрохинон обладает прямым антиоксидантным эффектом. У арбутина, наряду с прооксидантным действием, выявлена антиоксидантная активность, обусловленная, по всей вероятности, активацией факторов неферментной антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: арбутин, гидрохинон, свободно-радикальное окисление, антиоксидантная активность.

Многочисленные исследования последних лет показали, что активные формы кислорода (АФК) — важное звено многих физиологических процессов

в живых организмах. Вместе с тем, избыточное образование АФК вызывает нарушение клеточного гомеостаза и лежит в основе перекисного окисления липидов (ПОЛ). Равновесие между продукцией и выгодной и безопасной утилизацией свободных радикалов обеспечивает антиоксидантная система защиты тканей. Нарушение баланса между антиоксидантной и оксидантной системами организма приводит к развитию большого числа заболеваний человека [1, 2, 11].

В этих условиях для поддержания гомеостаза патогенетически обоснованным является введение лекарственных препаратов, повышающих возможности антиоксидантной защиты организма [11]. Однако, несмотря на исключительную значимость рассматриваемой проблемы, в распоряжении практического врача до сих пор остается весьма ограниченный перечень фармакологических средств, используемых как антиоксиданты. С этих позиций большой интерес представляют антиоксиданты растительного происхождения, которые доказали свою эффективность и низкую токсичность [3, 4]. Не секрет, что в последнее время актуальность использования лекарственных растений и фитопрепаратов в качестве полифункциональных средств неизмеримо возросла. Антиоксиданты на основе растений широко применяют не только в комплексной терапии заболеваний, но и как самостоятельные средства. Хорошо известна антиоксидантная активность таких растений, как ортилия однобокая, толокнянка, грушанка круглолистная и др. В свою очередь, препараты растительного происхождения представляют собой отдельные группы БАВ или их смеси,

фармакологические свойства которых обусловлены гармоничным сочетанием и взаимодействием веществ, содержащихся в растительном сырье и обладающих разной степенью выраженности лечебными свойствами. Несомненно, терапевтический эффект лекарственных средств на основе растительного сырья определяется всей совокупностью веществ, содержащихся в растениях [4, 6]. При этом, особое внимание заслуживают фенольные соединения, являющиеся обязательными компонентами растений.

Многие растения-антиоксиданты содержат в своем составе арбутин и гидрохинон. Известно, что арбутин подавляет перекисное окисление линолевой кислоты и нейтрализует свободные радикалы в бесклеточных системах *in vitro*. Имеются сведения, что арбутин защищает кожу от повреждений, вызванных свободными радикалами [5]. Вместе с тем, в опытах *in vivo* показано, что отвары толокнянки, проявляют антигипоксическое действие, которое авторы связывают с содержанием в них гидрохинона. Описано влияние гидрохинона на некоторые метаболические процессы, поглощение кислорода тканями, содержание в крови глюкозы и др. В литературе приводятся данные и о других терапевтических эффектах арбутина и гидрохинона. Однако влияние этих веществ на процессы свободно-радикального окисления (СРО) до конца не изучено. Более того, в литературе нет единого мнения, какому из этих веществ присуща более выраженная антиоксидантная активность. Между тем, не исключено, что именно арбутин и гидрохинон обеспечивают развитие противовоспалитель-

ного и диуретического эффектов многих растений. В связи с вышеизложенным, представлялось важным провести сравнительное квантово-химическое исследование структуры молекул арбутина и гидрохинона и изучить влияние этих веществ на процессы свободно-радикального окисления в крови крыс в условиях экспериментального формалинового воспаления.

Материалы и методы

Квантово-химические расчеты структур молекул проводились с использованием метода функционала плотности DFT B3LYP, базиса 6-31G** (d,p). Для оптимизированной геометрии был проведен расчет инфракрасного спектра, отсутствие отрицательных частот доказывает стабильность найденных структур. Расчет выполнен с помощью программного комплекса PC GAMESS (Firefly), версия 7.1.C., разработанная группой под руководством профессора Грановского А.А., в лаборатории химической кибернетики МГУ [12, 13].

Для изучения антиоксидантной активности арбутина и гидрохинона была избрана модель экссудативного воспалительного отека лап крыс. Данная методика позволяет оценить активность антиоксидантной и оксидантной систем в крови в условиях экспериментального воспаления. Влияние арбутина и гидрохинона на процессы свободно-радикального окисления изучали на третьи сутки эксперимента, так как ранее было показано, что максимальные изменения антиоксидантного и оксидантного статуса возникают через три дня после введения формалина [9]. В тех же экс-

периментальных условиях было исследовано влияние арбутина и гидрохинона на процессы СРО в ткани почек.

Опыты *in vivo* по изучению антиоксидантных и оксидантных свойств фенологликозида арбутина и гидрохинона проводили на крысах-самцах линии *Wistar* массой 200-220 г. Для эксперимента брали две группы животных. Одной группе крыс в течение двух недель вводили зондом в желудок арбутин в дозе 18 мкМоль/кг, а второй — гидрохинон в той же дозировке.

Затем через трое суток производили декапитацию и брали для анализа кровь и почки. Процесс свободно-радикального окисления оценивали как единство оксидантной и антиоксидантной систем. Для этого в плазме крови и гомогенате коркового вещества почек определяли показатели оксидантного статуса: содержание тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБРП), в том числе малонового диальдегида и общую оксидантную активность (ОАА) [10]. ОАА — суммарный показатель концентрации всех оксидантов и свободнорадикальных метаболитов — оценивали по накоплению в модельной системе продуктов перекисного окисления липидов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой.

Антиоксидантный статус в гемолизате эритроцитов и гомогенате коркового вещества почек оценивали по изменению интегративного показателя общей антиоксидантной активности (ОАА) и активности антиоксидантных ферментов: каталазы (КАТ), супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). ОАА определяли по степени ингибирования Fe^{2+} -аскорбат-индуцированного окисления ТВИН-80 гемолизатом эри-

троцитов (либо гомогенатом ткани). Активность КАТ оценивали по содержанию цветных комплексов молибдата натрия с перекисью водорода. Активность СОД — по реакции восстановления нитротетразолия супероксидными радикалами [10]. Маркером активности ГПО служило определение неокисленного глутатиона по цветной реакции с реактивом Эллмана [7].

Предварительно антиоксидантная активность арбутина и гидрохинона изучалась теоретически. Был проведен квантово-химический расчет термодинамики процессов взаимодействия арбутина и гидрохинона с гидроксильным

радикалом.

Результаты обрабатывали статистическим методом вариационных рядов Стьюдента. Полученные данные сравнивали с показателями оксидантной и антиоксидантной активности в крови и почках крыс в условиях формалинового воспаления.

Результаты и их обсуждение

Результаты квантово-химических исследований представлены в табл. 1 и 2. На рис. 1 и 2 представлены оптимизированные структуры арбутина и гидрохинона.

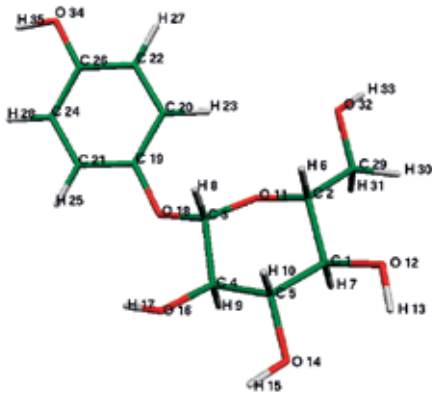


Рис. 1. Пространственное строение и оптимизированная структура молекулы арбутина

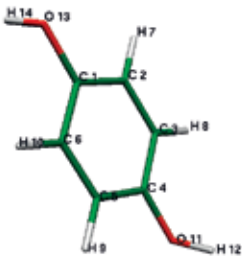


Рис. 2. Пространственное строение и оптимизированная структура молекулы гидрохинона

Таблица 1

Термодинамика процесса образования радикалов арбутина при взаимодействии с гидроксильным радикалом

Радикал	dG, кДж/моль	dG pсм, кДж/моль	dH, кДж/моль	dH pсм, кДж/моль	dS, кДж/ моль
Арбутин Н13	-38,440	-62,057	-40,239	-63,856	-6,034
Арбутин Н15	-45,744	-69,089	-39,696	-63,041	20,285
Арбутин Н17	-47,133	-67,406	-41,622	-61,895	18,482
Арбутин Н33	-61,788	-75,841	-57,487	-71,540	14,427
Арбутин Н35	-140,467	-165,323	-143,128	-167,984	-8,924

Наибольшая антирадикальная активность для молекулы арбутина наблюдается при взаимодействии центра Н35 с гидроксильным радикалом энергия Гиббса -165,323 кДж/моль.

Таблица 2

Термодинамика процесса образования радикалов гидрохинона при взаимодействии с гидроксильным радикалом

Радикал	dG, кДж/моль	dG рсм, кДж/моль	dH, кДж/моль	dH рсм, кДж/моль	dS, кДж/моль
Гидрохинон Н12	-149,156	-173,637	-141,864	-166,345	24,459
Гидрохинон Н14	-149,024	-173,457	-141,8	-166,229	24,242

В молекуле гидрохинона центры Н12 и Н14 эквивалентны, энергии Гиббса взаимодействия равны и составляют — 173,637 кДж/моль.

Из термодинамических данных, рассчитанных в водной среде в модели РСМ, видим, что наибольшей антирадикальной активностью обладает молекула гидрохинона. Разница энергий Гиббса для арбутина и гидрохинона 8,14 кДж/моль.

Тогда соотношение констант равновесия этих процессов для данных молекул при температуре 298 К равно 28,71. Значит, арбутин будет проявлять антирадикальную активность сравнимую с гидрохиноном лишь в концентрациях в 29 раз больших, чем гидрохинон.

В табл. 3 приведены результаты исследования влияния длительного введения арбутина и гидрохинона на показате

Таблица 3

Влияние арбутина и гидрохинона на показатели свободно-радикального окисления в крови крыс

ТБРП(мкМ)	ОАА(%)	КАТ(%)	СОД(%)	ГПО(ЕД/мгНв)	ОАА(%)
Интактные животные					
N=22 2,5±0,22	N=20 45±1,1	N=34 12,2±1,27	N=29 16,9±0,8	N=26 233±7,3	N=26 74±0,5
Формалиновое воспаление					
N=29 4,1±0,21*	N=28 49±1,2*	N=33 22,4±1,02*	N=26 28,3±1,1*	N=30 243±11,2	N=27 88±0,9*
Арбутин					
N=21 4,3±0,13*	N=21 75±1,6*	N=14 10,9±2,64	N=19 31,5±1,51*	N=17 336±27,8*	N=19 71±2,8
Гидрохинон					
N=19 2,7±0,18	N=17 27±3,1*	N=23 27,4±1,63*	N=20 25,5±1,53*	N=21 287±9,2*	N=20 79±1,5*

Примечание:

Н — количество экспериментов; звездочками обозначены достоверные изменения (p<0,05) по отношению к интактным животным, подчеркнуты цифры, достоверно отличающиеся от показателей крыс с формалиновым воспалением.

тели свободно-радикального окисления в крови крыс.

Из табл. 3 видно, что формалиновое воспаление индуцировало у животных изменения процесса свободно-радикального окисления, которые можно охарактеризовать как развитие окислительного стресса. На это указывает существенный рост содержания в крови тиобарбитуратреактивных продуктов, что обусловило повышение показателя общей оксидантной активности. Не удивительно, что это привело к активации таких быстро реагирующих антиоксидантных ферментов как каталаза и супероксиддисмутаза, что и обеспечило значительный рост интегративного показателя общей антиоксидантной активности.

На этом фоне длительное применение арбутина приводило к развитию разнонаправленных эффектов. С одной стороны, мы наблюдали существенный рост общей оксидантной активности, что потребовало активизации супероксиддисмутаза и, главным образом, глутатионпероксидазы, активность которой увеличилась примерно на 40%. Уменьшение показателя КАТ указывает на истощение к данному моменту возможностей образования этого фермента. С другой стороны, в экспериментах с использованием арбутина показатель общей антиоксидантной активности ОАА значительно уменьшился, практически достигнув уровня интактных животных. Это заставляет предположить активизацию под влиянием арбутина факторов неферментной антиоксидантной защиты, что и обусловило снижение такого интегративного показателя как ОАА.

Применение гидрохинона привело к развитию несколько иной картины. Как

видно из той же табл. 3, для данного соединения была характерна четко выраженная прямая антиоксидантная активность. Это выразилось в снижении до уровня интактных крыс содержания в крови тиобарбитуратреактивных продуктов и в значительном подавлении показателя общей оксидантной активности, которая уменьшилась более чем в 1,5 раза в сравнении с крысами, не получавшими гидрохинон. Это указывает на прямую способность препарата «гасить» свободные радикалы, уменьшая их количество в плазме крови. Естественно, на этом фоне не потребовалось значительного напряжения системы антиоксидантной защиты, показатели которой существенно не изменились по сравнению с исходным уровнем.

Результаты проведенных экспериментальных исследований показали, что арбутин и гидрохинон способны воздействовать на процессы свободно-радикального окисления в крови крыс. При этом эффекты исследованных препаратов существенно различались. Так, выявленное нами в опытах *in vivo* резкое снижение общей оксидантной активности указывает на снижение концентрации свободных радикалов в плазме. По-видимому, это обусловлено прямой антирадикальной активностью гидрохинона, позволяя ему выступать в качестве своеобразной ловушки продуктов свободно-радикального окисления. Напротив, при введении арбутина в кровь отмечался рост показателей оксидантного статуса. При этом общая антиоксидантная активность крови все же заметно снижалась, что указывает на активизацию процессов неферментной антиоксидантной защиты. Это может обозначать,

что арбутин в данных экспериментальных условиях активирует неферментные механизмы антиоксидантной защиты, которые определяются некоторыми водорастворимыми соединениями, находящимися в плазме крови (аскорбат, глутатион, мочева кислота и др.), а также рядом жирорастворимых компонентов клеточных мембран (α -токоферол, ретинол и др.). Не исключено, что изученный препарат тем или иным способом активирует один или несколько неэнзимных механизмов, что и обеспечивает в итоге снижение показателя ОАА. Не секрет, что все неферментные антиоксиданты, нейтрализуя АФК, образуют радикальные производные [1, 2, 11]. Так что в основе прооксидантного эффекта арбутина может лежать накопление оксидантных производных фенологликозида, образующихся в процессе нейтрализации свободных радикалов.

Приведенные результаты позволяют утверждать, что антиоксидантный эффект гидрохинона выше, чем у арбутина. Данные, полученные методом квантово-химического анализа, подтверждают более высокую антирадикальную активность гидрохинона, превышающую такую арбутина в 29 раз.

В экспериментах на животных также было установлено, что арбутин обеспечивает рост активности глутатионпероксидазы, тогда как гидрохинон оказывает направленное действие на каталазу. Интересно, что субстратом для обоих ферментов может служить перекись водорода. При этом сродство глутатионпероксидазы к перекиси водорода выше, чем у каталазы. Поэтому ГПО более эффективно работает при низких концентрациях перекиси водорода. В то же время в за-

щите клеток от окислительного стресса, вызванного высокими концентрациями перекиси водорода, ключевая роль принадлежит каталазе [11]. Исходя из этого, можно предположить, что арбутин и гидрохинон влияют на продукцию перекиси водорода в средах организма. Изменение концентрации перекиси водорода, вероятно, вторично, и объясняется высоким сродством гидрохинона и арбутина к гидроксильным радикалам. Возможно, менее выраженный антирадикальный эффект арбутина обеспечивает активацию глутатионпероксидазы, которая, как известно, наряду с перекисью водорода нейтрализует гидроксильные радикалы. В основе описанных эффектов могут лежать и другие механизмы. Так, есть данные, что неферментные антиоксиданты растительного происхождения способны вызывать индукцию генов, ответственных за синтез антиоксидантных ферментов [7]. Не исключено, что неэнзимные антиоксиданты, повышая буферную емкость антиоксидантной системы, вторично защищают ферменты [2, 11]. Таким образом, несмотря на некоторый рост показателей оксидантного статуса, в крови и в почках опытных крыс преобладает активация антиоксидантной системы. Это является еще одним доказательством антиоксидантного действия исследуемых веществ.

Не исключено, что разная направленность действия арбутина и гидрохинона обусловлена особенностями их химического строения и, следовательно, отличиями в фармакокинетике. Известно, что арбутин является фенологликозидом, который под влиянием фермента арбутазы расщепляется на глюкозу, свободный гидрохинон и воду. В свою очередь, гидро-

хинон относится к веществам с лабильным водородом. Высокая реакционная способность гидрохинона позволяет ему активно взаимодействовать со свободными радикалами в общем кровотоке. Ясно, что в этом случае антиоксидантная активность гидрохинона будет преобладать в крови. Ввиду того, что арбутин отличается от гидрохинона наличием гликона, напрашивается предположение, что разница в эффектах этих соединений обусловлена именно фрагментом молекулы глюкозы. Вероятно, по сравнению с гидрохиноном арбутин более устойчив к окислению, что позволяет ему транспортироваться в почки в неизмененном виде. Не исключено, что благодаря гликону арбутин в меньшей степени реабсорбируется в канальцах почек, где, таким образом, накапливается. Есть предположение, что структурные особенности арбутина позволяют ему взаимодействовать с мембранными структурами клетки, что ожидаемо должно усилить его влияние на процессы свободно-радикального окисления в почках. Нельзя не отметить, что глюкоза обладает собственной антиоксидантной активностью, усиливающей эффект арбутина [11]. Так или иначе, не вызывает сомнений, что фрагмент глюкозы, встроенный в молекулу арбутина, изменяет антиоксидантную активность вещества.

Выводы

Таким образом, в экспериментах *in vivo*, а также методом квантово-химических расчетов было доказано, что гидрохинон и арбутин обладают выраженной активностью в отношении процессов свободно-радикального окисле-

ния. Вместе с тем, структурные отличия обеспечивают веществам разный характер этого действия. Было установлено, что гидрохинон обладает прямым антиоксидантным эффектом. У арбутина, наряду с прооксидантным действием, выявлена антиоксидантная активность, обусловленная, по всей вероятности, активацией факторов неферментной антиоксидантной защиты.

Список литературы

1. **Варшавский Б.Я.** Химия и биохимия свободно-радикального окисления. — Барнаул. — 2002. — с. 36.
2. **Владимиров Ю.А.** Перекисное окисление липидов в биологических мембранах — М.: Наука. — 1972. — с. 252.
3. **Владимиров Ю.А.** Свободные радикалы в живых системах Биофизика. Итоги науки и техники / Ю.А. Владимиров и др. — М.: ВИНТИ АН СССР. — 1991. — с. 252.
4. **Замятина С.В.** Влияние растительных сборов с противовоспалительной активностью на процессы свободно-радикального окисления / Замятина С.В., Брюханов В.М., Зверев Я.Ф.//Барнаул. — 2006. — с. 13.
5. **Куцик Р.В., Зузук Б.М., Недоступ А.Т., Пецк Т.** Толокнянка обыкновенная. // Провизор. — 2003. — № 18.
6. **Макарова М.Н.** Антирадикальная активность флавоноидов и их комбинаций с другими антиоксидантами // Фармация. — 2004. — № 2. — с. 30-32.
7. **Моин В. М.** Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело. — 1986. — № 12. — с. 724-727.
8. **Плотникова Т. М.** Влияние экстракта маакии амурской на липидный

- спектр и перекисное окисление липидов в мембранах эритроцитов после овариоэктомии у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2008. — Т.7. — № 6. — с. 28-30.
9. **Тихомирова С.В.** Антиоксидантное действие сбора лекарственных растений, применяемого при экспериментальном гломерулонефрите // Нефрология. — 2004. — Т.8. — № 2. — с. 155-156.
10. **Чевари С.** Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лабораторное дело. — 1991. — № 10. — с. 9-13.
11. **Шанин Ю.Н.** Антиоксидантная терапия в клинической практике — СПб.: ЭПБИ-СПб. — 2003.
12. **Granovsky A. A.** PC GAMESS/Firefly version 7.1.C, [www http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html](http://classic.chem.msu.su/gran/gamess/index.html)
13. **Schmidt M.W., Baldridge K.K., Boatz J.A. et al.** // J.Comput.Chem. — 1993. — 14. — p. 1347-1363.
10. **Чевари С.** Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте

Arbutin's and hydroquinone's influence on free radical oxidation in rats blood.

V.M. Brukhanov, I.V. Smirnov, A.A. Bondarev, O.S. Talalaeva,
V.M. Shabanova, Y.F.Zverev, V.V. Udut

The research confirmed that arbutin and hydroquinone have antioxidant activity. With this ,the structural distinctions insure different character of antiradical action for agents. It was established, that theoretically direct (not enzymatic) antioxidant effect of hydroquinone was more above arbutin.

Key words: arbutin, hydroquinone, antioxidant activity.