

РЕАКТИВАЦІЯ СИСТЕМИ ГЛУТАТІОНУ ФЕНОЛЬНИМИ АНТИОКСИДАНТАМИ

Загайко А.Л.¹, Домарев А.П.², Кричковська Л.В.², Жолудов Ю.Т.³,
Ковальов В.Н.¹, Литкін Д.В.¹, Демешко О.В.¹

¹ Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

² Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», м. Харків, Україна

³ Харківський національний університет радіоелектроніки, м. Харків, Україна

Ретроспективний аналіз всесвітнього пулу даних наукових робіт в біомедичній галузі демонструє, що розвиток та клінічна маніфестація більшості патологічних станів в тій чи іншій мірі пов'язана з індукцією різних шляхів утворення активованих кисневмісних метаболітів (АКМ) – $O_2^{\bullet-}$, HO_2^{\bullet} , HO^{\bullet} , NO^{\bullet} , RO^{\bullet} , RO_2^{\bullet} , H_2O_2 , 1O_2 , $HOCl$, $HOBr$, HOI [1, 3, **Ошибка! Источник ссылки не найден.**]. Переважно це стосується запальних процесів, патологій обміну, нейродегенеративних розладів та малігнізації клітин, що пов'язана з окисним пошкодженням ДНК. Ендогенна антиоксидантна система організму людини, яка захищає клітини від пошкодження радикалами кисню, підтримує баланс між швидкістю генерації АКМ та швидкістю нейтралізації цих молекул, порушення якого призводить до розвитку оксидативного стресу [9].

Нажаль, ендогенна антиоксидантна система не завжди спроможна захистити організм людини від оксидативного стресу, що з часом виливається в накопиченні пошкоджень генетичного апарату клітин та призводить до розвитку злоякісних новоутворювань. Через що, в медичній та фармацевтичній практиці певну увагу привертають рослини, які містять фенольні антиоксиданти та інші біологічно активні молекули, що володіють широким спектром дії на ендогенні мішені організму. Лікарські рослини України знаходять широке використання при терапії різних патологій завдяки їх активним сполукам, що грають важливу роль в регуляції перебігу клітинних окисно-відновних реакцій [2, 8].

Розвиток оксидативного стресу в клітині може бути попереджений за допомогою антиоксидантної терапії: в цих випадках для фармакокорекції порушень обмінних процесів в якості антиоксидантів використовують біофлавоноїди, що є вельми різноманітними за хімічною будовою та структурою (наявність гідроксильних, ацетильних, метильних й метоксильних радикалів в різних положеннях карбонового скелету). Ці флавоноїдні молекули приймають участь в одноелектронних реакціях з радикалами кисню: $Ф-OH+R^{\bullet} \rightarrow ФO^{\bullet}+HR$, можуть утворювати комплекси з іонами металів, таким чином, зменшуючи швидкість перебігу вільнорадикального окиснення й, як наслідок, надлишкове утворення радикалу HO^{\bullet} [1, 11]. Таким чином, найважливішим ефектом фенольних антиоксидантів є їх участь в нейтралізації активних форм кисню. Враховуючи вищенаведене, дослідження антиоксидантних властивостей природних сполук представляє значний інтерес для медичної та фармацевтичної практики.

З огляду на вищезазначене, метою нашої роботи стало вивчення антиоксидантної активності комбінованої композиції на основі рослинної сировини на моделях *in vitro* та *in vivo*.

Матеріали та методи. Перший фрагмент комплексного дослідження був присвячений вивченню інтегрального значення антиоксидантної активності та ідентифікації відновлюючих речовин в сировині (листі/траві) наступних рослин: іван-чай (*Chamerion angustifolium*), смородина чорна (*Ribes nigrum*), суниця садова (*Fragaria ananassa*), ожина несійська (*Rubus nessensis*), лимонник китайський (*Schizandra chinensis*), з метою їх подальшого використання у складі антиоксидантного фітокомплексу. Суму антиоксидантів вилучали з досліджуваних зразків листя дистильованою водою (маса зразку – 1,0 г; об'єм екстрагенту – 30 см³). Екстракцію проводили на водяній бані в колбі зі зворотним холодильником впродовж 30 хвилин.

Антиоксидантну активність (АОА) екстрактів вказаних рослин визначали потенціометричним методом із застосуванням електрохімічного осередку, заповненого К,Na-буферним розчином (pH=7,4); медіаторна система – K₃[Fe(CN)]₆/K₄[Fe(CN)]₆; електроди – ЭВЛ-1М4 (Ag/AgCl) та ЭПЛ-02 (Pt); вольтметр – В234 [6]. Кількісне визначення АОА виконували проти стандартного зразка галової кислоти в інтервалі концентрацій 0,021-1,7 мг/см³, задана концентрація стандартних розчинів використовувалася для побудови градуіровочної прямої та визначення C_x. Інтегральне значення вмісту АОА (мг/г) визначали за формулою: $АОА = V_A \cdot C_x \cdot V_1 / V_A \cdot m^{-1}$, де V_A – об'єм зразку для аналізу (см³); C_x – значення антиоксидантної активності за градуіровочною прямою (мг/см³); V₁ – загальний об'єм аналізованого зразку (см³); V₁/V_A – розведення; m – маса аналізованого зразку (г).

Значення окисно-відновного потенціалу (ОВП) для фітокомплексу отримані методом циклічної вольтамперометрії за допомогою електрохімічної станції Autolab PGSTAT128N. Дослідження проводилося в стандартному триелектродному електрохімічному осередку з електродами: робочій – скловуглецевий, допоміжний – Pt, порівняльний – Ag/AgCl; швидкість розгортки потенціалу – 100 мВ/с.

Об'єктом досліджень *in vivo* став збір антиоксидантний (ЗА-Фіто+К), що містив водні екстракти листя суниці, листя смородини, листя ожини, листя лимоннику, трави іван-чаю та додатково кверцетин. Оскільки довгострокові депресивні стани й хронічний стрес викликають генералізовані зміни в організмі з порушенням внутріклітинного гомеостазу, метаболізму та про-антиоксидантного балансу, досліджуваний препарат було доцільно вивчити на моделі глюкокортикоїд-індукованого окислювального стресу [5].

Дослід виконували на 40 білих нелінійних щурах масою 200-240 г, що були поділені на 5 експериментальних груп. Глюкокортикоїд-індукований окислювальний стрес моделювали згідно стандартній методиці шляхом щоденного внутрішньошлункового введення преднізолону в дозі 50 мг/кг протягом 14 діб. Через 3 години після кожного введення преднізалону тваринам внутрішньошлунково вводили засіб ЗА-Фіто+К в дозах 100 й 200 мг/кг та аскорбінову

кислоту (в якості препарату порівняння) в дозі 100 мг/кг у вигляді водних розчинів. Інтактним тваринам вводили відповідну кількість води очищеної задля відтворення рівних умов експерименту. На 15-у добу експерименту проводили евтаназію тварин шляхом декапітації під хлороформним наркозом, відбирали кров для отримання сироватки; проводили лапаротомію й забирали верхній центральний сегмент печінки для отримання гомогенату. Отриманий біологічний матеріал щурів досліджували на кількісний вміст В гомогенаті печінки й сироватці крові визначали вміст продуктів перекісного окиснення ліпідів: дієнові кон'югати (ДК) і продукти, що реагують з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-АП). В гомогенаті тканин печінки вимірювали маркери активності антиоксидантної системи: вміст відновленого глутатіону (ВГ) та активність каталази [1].

Експериментальні дані були опрацьовані методами варіаційної статистики з використанням стандартного пакету програм «Statistica 6.0» за допомогою t-критерію Стьюдента для незалежних вибірок. Вірогідною вважалася відмінність на рівні значущості $p < 0,05$ (вираховували середнє арифметичне та його стандартну похибку).

Результати та їх обговорення. Оцінка показника АОА екстрактів трави іван-чаю, листя смородини чорної, ожини несійської, суниці садової та лимоннику китайського, які містять широкий спектр різних біологічно активних сполук показала, що вони мають помірну, але не досить високу антиоксидантну активність. З урахуванням отриманих результатів, був розроблений склад фітокомплексу з потужною антиоксидантною властивістю, що пов'язана з синергією активних компонентів. Подальші пошукові дослідження, направлені на підсилення антиоксидантних властивостей композиції, показали, що введення до складу засобу такого флавонола, як кверцетин, дозволяє збільшити показник АОА фітозбору майже в два рази від вихідного значення (табл. 1).

Таблиця 1

Антиоксидантна активність монокомпонентних екстрактів та фітокомплексу

Сировина досліджуваних екстрактів	АОА, мг/г:
Листя смородини чорної	43,2
Трава іван-чаю	53,7
Листя ожини несійської	65,8
Листя суниці садової	61,2
Листя лимоннику китайського	5,2
Антиоксидантний фітокомплекс	116,5
Антиоксидантний фіто комплекс з кверцетином (ЗА-Фіто+К)	247,0

Система антиоксидантного захисту складається з двох основних ланок – ферментативної (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза) й неферментативної (низькомолекулярні антиоксиданти; біофлаваноїди; вітаміни А, Е, С; глутатіон тощо). Флавоноїди рослин здатні впливати на редокс-статус біологічних систем [4], тобто мають здатність регулювати інтенсивність перебігу окисних процесів та корегувати наслідки окислювального стресу.

Загальновідомо, що в реакції відновлення глутатіону відбувається окислення NADPH, який забезпечує цю реакцію відновними еквівалентами: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$; $E^0 GSSG, 2H^+ / 2GSH = -0,24$ В. Ця реакція має важливе значення, оскільки відновлений глутатіон є основним ендogenous антиоксидантом, що визначає окисно-відновну характеристику внутрішньоклітинного середовища. Визначено, що значення ОБП для розробленого фітокомплексу складає 0,24 В. Це значення є значно меншим, ніж у вітаміну С ($E_{ascorbyl\bullet, H^+ / ascorbate} = 0,28$ В) й вітаміну Е ($E_{\alpha\text{-Toc}\bullet, H^+ / \alpha\text{-TocH}} = 0,50$ В) [12]. Отже, фенольні антиоксиданти фітокомплексу можуть служити роль донорів атомів водню, забезпечуючи відновними еквівалентами систему глутатіону, яка, в свою чергу, частково підтримує відновлену форму вітамінів С та Е, що виконують захисну функцію в різних компартментах клітини при оксидативному стресі [15].

Крім фенольних антиоксидантів, важливим компонентом в складі фітокомплексу є аскорбінова кислота (на рівні 1,6 мас.%). Вміст аскорбінової кислоти в такій кількості приводить до утворення комплексу у вигляді аскорбінової кислоти, напівгідроаскорбінової кислоти й дегідроаскорбінової кислоти в присутності відновленого глутатіону [13], таким чином, цей комплекс виконує роль редокс-буфера, головною функцією якого є нейтралізація радикалів кисню.

При дослідженні антиоксидантних властивостей комплексу ЗА-Фіто+К на тваринній моделі *in vivo* було продемонстровано, що досліджуваний тест-зразок здатен виявляти помірну антиоксидантну дію. Обидві дослідні дози були здатні практично на одному рівні вірогідно зменшувати вміст дієнових кон'югантів та ТБК-активних продуктів в сироватці крові ($p < 0,05$ проти контрольної патології). З одного боку це вказує на зменшення процесів перекисного окиснення ліпідів в різних клітинах, а з іншого – на зменшення цитолізу клітин, до якого саме й призводять ці процеси.

По відношенню до маркерів ПОЛ/АОС в тканинах печінки більш виразний антиоксидантний вплив ЗА-Фіто+К продемонстрував в дозі 200 мг/кг, що свідчить про дозозалежність питомого ефекту. Комбінований фітозбір в дозі 200 мг/кг був здатний викликати значущу корекцію співвідношення анти- й прооксидантних маркерів, що свідчить його здатність перешкоджати процесам ліпопероксидації в печінці (табл. 2). Й хоча досліджуваний засіб в цій дозі спрацював на рівні референтної групи, де використовували високі дози аскорбінової кислоти, скоріше за все фітозбір має більш сприятливий профіль безпеки з боку сечовидільної системи [10].

ЗА-Фіто+К в дозі 100 мг/кг був здатний корегувати лише деякі з досліджуваних параметрів на тлі стійкого глюкокортикоїд-індукованого окислювального стресу у щурів. В першу чергу, це свідчить про інтенсивність розвитку оксидативного стресу, що чинить модельна патологія, для корекції якого недостатньо суми антиоксидантів, що містяться в цій дозі засобу. Проте, можливо, ця доза може бути ефективною при довгостроковому профілактичному застосуванні.

Таблиця 2

Вміст про- й антиоксидантних маркерів в сироватці крові й в гомогенаті печінки щурів після 14 днів внутрішньошлункового введення ЗА-Фіто+К за умов моделювання окислювального стресу, n=8

Показник	Інтактний контроль	Контроль-на патологія	ЗА-Фіто+К 100 мг/кг	ЗА-Фіто+К 200 мг/кг	Аскорбінова кислота 100 мг/кг
<i>в сироватці крові</i>					
ДК (нмоль/мл)	13,62±0,7 4	18,48±1,02 *	15,37±0,92 **	14,26±0,70 **	14,16±0,78 **
ТБК-АП (нмоль/мл)	1,36±0,12	1,96±0,10 *	1,54±0,08 **	1,51±0,07 **	1,48±0,16 **
<i>в гомогенаті тканин печінки</i>					
ДК (нмоль/мг)	2,86±0,22	3,84±0,28 *	3,35±0,18 **	3,07±0,21 **	3,12±0,12 **
ТБК-АП (нмоль/мг)	0,22±0,04	0,40±0,08 *	0,35±0,03 *	0,28±0,03 **	0,26±0,04 **
ВГ (мг/г)	2,62±0,24	1,42±0,20 *	1,90±0,09 */**	2,10±0,12 **	2,05±0,2 **
Активність каталази (пит. акт./мг)	0,29±0,02	0,12±0,04 *	0,14±0,07 *	0,19±0,03 */**	0,22±0,02 */**

Примітка: * – відмінність вірогідна, відносно значень тварин групи інтактного контролю ($p < 0,05$); ** – відмінність вірогідна, відносно значень тварин групи контрольної патології ($p < 0,05$);

Дослідження продемонстрували, що ЗА-Фіто+К в дозі 200 мг/кг володіє помітними антиоксидантними властивостями, та потенційно володіє гепатопротекторним ефектом, який також реалізується через антиоксидантний механізм дії. На даному етапі дослідження даний засіб вже може бути застосований, як альтернатива сучасним антиоксидантним біологічно активним добавкам та є перспективним для впровадження в фармацевтичну промисловість.

Висновки

Виходячи з отриманих даних, можна підсумувати, що компоненти розробленого антиоксидантного фіто комплексу є синергетиками в перебігу реакцій, направлених на нейтралізацію надмірної кількості кислородних радикалів.

У дослідженого антиоксидантного збору ЗА-Фіто+К в дозі 100 мг/кг був виявлений помірний антиоксидантний ефект, що сприяв частковій нормалізації окремих показників про- й антиоксидантної системи. При застосуванні збору ЗА-Фіто+К в дозі 200 мг/кг був помічений більш виражений антиоксидантний ефект, що за характером впливу на досліджувані показники був порівняний з високою дозою аскорбінової кислоти.

Література

1. Кучеренко М.Е., Бабенюк Ю.Д., Войціцький В.М. Сучасні методи біохімічних досліджень. Учебний посібник. - Київ: Фітосоціоцентр, 2001. - 424 с.
2. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Під.ред. А.М.Грозінський. К.: Видавництво «Українська Радянська Енциклопедія ім. М.П.Бажана, УВКЦ «Олімп», 1992. –544с.
3. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Кандалинцева Н.В. Фенольные антиоксиданты в медицине и биологии. Строение, свойства, механизмы действия. LAP. 2012. – 488с.
4. Оксидативный стресс и воспаление: патогенетическое партнерство / Под ред. О.Г. Хурцилавы, Н. Н. Плужникова, Я. А. Накатиса. Издательство СЗГМУ им. И. И. Мечникова, 2012. — 340 с.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева – 2-е издание, переработанное и дополненное, 2005, 832 с.: ил.
6. Шарафутдинова Е.Н., Иванова А.В., Матерн А.И. Качество пищевых продуктов и антиоксидантная активность. Аналитика и контроль, 2011, т. 15, № 3, с.281-285.
7. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization journal*, 5(1), 9-19.
8. Brewer M.S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2011 vol. 10, p .221-247
9. Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine*, 48(6), 749-62.
10. Gurm, H., Sheta, M. A., Nivera, N., & Tunkel, A. (2012). Vitamin C-induced oxalate nephropathy: a case report. *Journal of community hospital internal medicine perspectives*, 2(2), 10.3402/jchimp.v2i2.17718. doi:10.3402/jchimp.v2i2.17718
11. Hermes-Lima M. *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, 2004, Chapter 12, p.319 – 368.
12. Hermes-Lima M. *Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, 2004, Chapter 12, p.319 – 368.
13. Sapper H., Kang S, Paul H. et al. The reversibility of the vitamin C redox system: Electrochemical reasons and biological aspects. 1982, *Z. Naturforsch.*, B. 37, p.942-946 Lü,
14. J. M., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2009). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(4), 840-60.
15. Traber, M. G., & Stevens, J. F. (2011). Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free radical biology & medicine*, 51(5), 1000-13.