

ВИВЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕКСТРАКТУ “ЛОКОРИН” В УМОВАХ IN VITRO TA IN VIVO

Л.М.Вороніна, Л.В.Галузинська, К.В.Стрельченко

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: протизапальна активність; антиоксидантно-прооксидантний статус; антиоксидантна дія; перекисне окиснення ліпідів; поліфенольні сполуки; екстракт “Локорин”

Досліжені антиоксидантні властивості екстракту “Локорин”, який згідно з даними попередніх досліджень володіє високою протизапальною активністю. Антиоксидантні властивості екстракту були вивчені у дослідах *in vitro*, а також *in vivo* на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту. Встановлено, що досліджуваний екстракт блокує активацію процесів як спонтанного, так і аскорбат-індукованого ПОЛ у дослідах *in vitro* більш ефективно порівняно з α -токоферолом, що свідчить про високу антиокиснювальну активність локорину. У дослідах *in vivo* встановлено, що введення щуром локорину покращує антиоксидантно-прооксидантний статус печінки щурів за умов гострого тетрахлорметанового гепатиту. Отримані дані свідчать про наявність у ньому потужних антиоксидантних властивостей, що може бути одним з механізмів його протизапальної дії.

Як відомо, нестероїдні протизапальні препарати, які широко використовують у сучасній медицині для лікування захворювань запального генезу, мають низку побічних ефектів, серед яких найголовнішими є гепатотоксичність, нефротоксичність та ембріотоксичність [15, 18]. Це робить актуальною проблему пошуку нових безпечних протизапальних препаратів, особливо серед засобів рослинного походження. Останні на тлі незначної кількості побічних ефектів мають широкий спектр дії на всі ланки запального процесу [8, 12].

Результати досліджень, які проводилися на кафедрі біологічної хімії НФаУ, довели, що екстракт “Локорин”, отриманий на кафедрі фармакогнозії НФаУ з надземної частини Лядвенця рогатого, має високу протизапальну активність на моделях ексудативного, проліферативного та альтеративного запалення [3]. Проте механізми дії екстракту залишаються до кінця не вивченими.

Згідно з даними фітохімічних досліджень вивчаємий нами ек-

тракт містить у своєму складі ряд поліфенольних сполук, у тому числі оксикоричні кислоти, оксикумарини та флавоноїди, які, як відомо, мають потужні антиоксидантні властивості. Антиоксидантні властивості поліфенольних сполук пов’язують з їх спроможністю служити уловлювачем для активних метаболітів кисню [12, 13, 20, 21], зв’язувати іони металів, які є індукторами перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [9], та інгібувати активність ряду редокс-чутливих транскрипційних факторів, зокрема, NF κ B (nuclear factor карпа В) та AP-1 (activator protein 1), а також прооксидантних ферментів [9-11, 14, 16, 17].

Враховуючи провідну роль активації вільноважильних процесів у патогенезі запалення [8, 15], можна припустити, що протизапальна активність екстракту “Локорин” пов’язана з антиоксидантними властивостями поліфенолів, які входять до його складу.

Виходячи з цього, ми поставили за мету дослідження антиоксидантних властивостей екстракту

“Локорин” у дослідах *in vitro* та *in vivo*. Як препарат порівняння у наших дослідах було використано α -токоферол, який є потужним ліпофільним антиоксидантом.

Матеріали та методи

Про антиокиснювальні властивості екстракту “Локорин” *in vitro* судили за його спроможністю блокувати спонтанне та аскорбат-індуковане ПОЛ за інкубації гомогенату печінки при $t = 37^{\circ}\text{C}$. До 25%-го гомогенату печінки, який готували на 100 mM Tris-HCl-буфері (рН 7,4), додавали екстракт “Локорин” з розрахунку 1 mg на 1 g тканини печінки у вигляді водного розчину або α -токоферол з розрахунку 1 mg на 1 g тканини. Кількість екстракту “Локорин”, що додавали до інкубаційного середовища, розраховували на основі дози, яка була визначена як найбільш ефективна в попередніх дослідженнях [3]. Інкубацію проводили у 100 mM Tris-HCl-буфері (рН 7,4) при 37°C з додаванням аскорбату (концентрація у середовищі інкубації — 0,5 mM) для аскорбат-індукованого ПОЛ. Вміст гомогенату печінки в середовищі інкубації становив 6,25%. Вміст ТБК-реактив-

Л.М.Вороніна — доктор біол. наук, професор, завідувачка кафедри біологічної хімії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

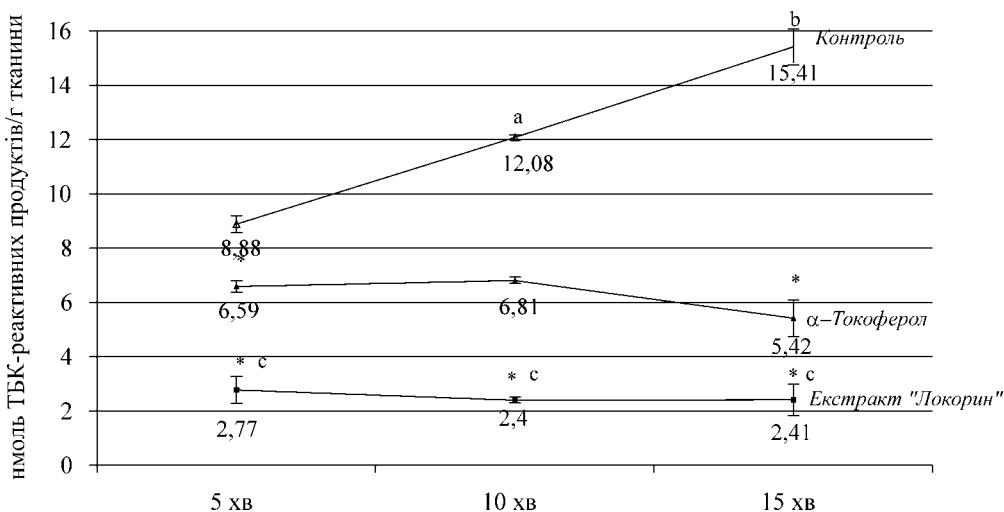


Рис. 1. Вплив екстракту "Локорин" та α -токоферолу на перебіг спонтанного ПОЛ при інкубації гомогенату печінки шурів при $t = 37^{\circ}\text{C}$ ($M \pm m$, $n=3-5$)

Примітки:

- * — зміни вірогідні відносно контролю;
- a — зміни вірогідні відносно 5 хв;
- b — зміни вірогідні відносно 10 хв;
- c — зміни вірогідні відносно α -токоферолу.

них продуктів визначали через 5, 10, 15 та 20 хв з моменту початку інкубації. Реакцію припиняли, через указані терміни додаючи до інкубаційного середовища 1,5 мл 40% розчину трихлороцтової кислоти. Визначення вмісту ТБК-реактивних продуктів проводили за методом І.Д.Стальної та Т.Г.Гаврішвілі за допомогою реакції з тіобарбітуровою кислотою [7].

Експериментальною моделлю для вивчення антиоксидантної дії локорину *in vivo* було обрано гострий тетрахлорметановий гепатит. Досліди були проведені на 28 статевозрілих білих нелінійних щурах-самцях з масою тіла 180-200 г. Тварини були розділені на такі дослідні групи: група інтактного контролю; контрольна патологія (тваринам внутрішньошлунково одноразово вводили 50%-олійний розчин тетрахлорметану в дозі 1 мл / 100 г маси тіла); тваринам третьої групи на тлі тетрахлорметанового ураження печінки вводили досліджуваний екстракт у дозі 50 мг / кг; тварини четвертої групи поряд з тетрахлорметаном отримували як референс-препарат α -токоферол у дозі 50 мг / кг. Досліджуваний екстракт та препарат порівняння вводили за годину до та через дві години після введення тетрахлорметану. Тва-

рин декапітували під легким ефірним наркозом через добу після введення CCl_4 . Дослідження проводили відповідно до "Загальних етических принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985).

Об'єктом дослідження був гомогенат печінки. Антиоксидантну активність розраховували за вмістом у гомогенаті ТБК-реактивних продуктів [7] за формулою:

$$\text{Антиоксидантна активність} = 100 \cdot (1 - C/C_0),$$

де: С — вміст ТБК-реактантів (нмоль/г) у печінці тварин дослідної групи; C_0 — вміст ТБК-реактантів (нмоль/г) у печінці тварин контрольної групи.

Інтенсивність ПОЛ у гомогенатах печінки визначали з додаванням аскорбату (концентрація у середовищі інкубації — 0,5 mM) для визначення аскорбат-індукованого ПОЛ та без нього для визначення спонтанного ПОЛ. Для вивчення спонтанного ПОЛ інкубацію проводили протягом 20 хв, а для аскорбат-індукованого — 10 хв [1]. Вміст дієнових кон'ю-

гатів (ДК) визначали спектрофотометрично в гептан-ізопропанольних екстрактах [2]. Вміст загальних ацилгідропероксидів (АГП) вимірювали за реакцією з тіоціанатом амонію [6]. Вміст відновленого глутатіону (GSH) визначали спектрофотометрично за оптичною густиною комплексу з алоксаном при 305 nm [5]. Катализну активність визначали спектрофотометрично за зниженням поглинання переоксиду гідрогену і виражали в мкмоль H_2O_2 / хв на mg білка [19].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням критерію Манна-Уїтні.

Результати та їх обговорення

Як видно з наведених даних (рис. 1, 2), при інкубації гомогенату печінки у буферному розчині при температурі 37°C спостерігається значне накопичення ТБК-реактивних продуктів, що свідчить про інтенсивний перебіг процесів ПОЛ. При цьому зростання вмісту ТБК-реактивних продуктів спостерігається упродовж перших 15 хв інкубації. Через 15 хв вміст ТБК-реактантів не змінюється, що, очевидно, пов'язано з вичерпанням субстратів ПОЛ. Накопичення ТБК-реактивних продуктів є

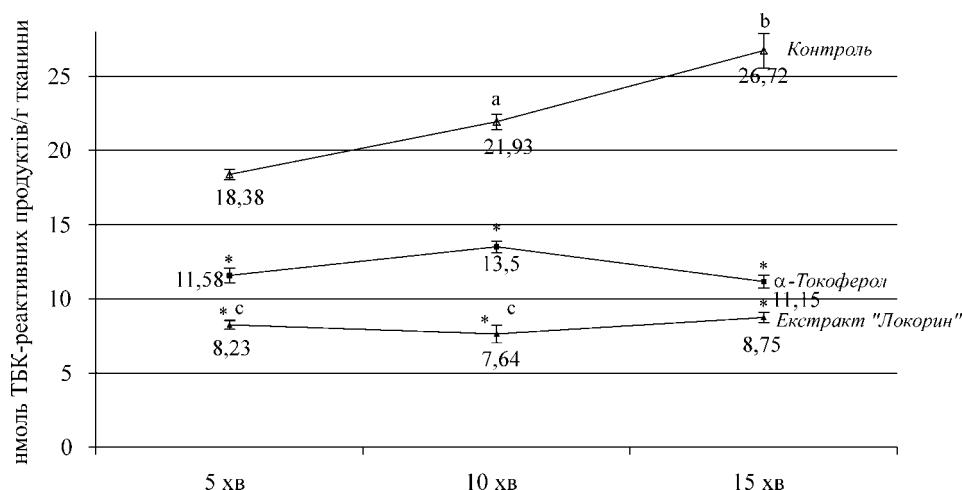


Рис. 2. Вплив екстракту "Локорин" та α -токоферолу на перебіг аскорбат-індукованого ПОЛ при інкубації гомогенату печінки щурів при $t = 37^{\circ}\text{C}$ у присутності аскорбату ($M \pm m$, $n=3-5$)

Примітки:

- * — зміни вірогідні відносно контролю;
- а — зміни вірогідні відносно 5 хв;
- б — зміни вірогідні відносно 10 хв;
- с — зміни вірогідні відносно α -токоферолу.

значно більш вираженим при додаванні до середовища інкубації аскорбату — потужного індуктора неферментативного ПОЛ. Так, швидкість накопичення ТБК-реактивних продуктів у перші 15 хв інкубації становить 0,41 нмоль/г тканини за 1 хв при спонтанному ПОЛ та 0,51 нмоль/г тканини за 1 хв при аскорбат-індукованому ПОЛ.

При додаванні до середовища інкубації локорину вміст ТБК-реактивних продуктів через 5 хв з початку інкубації є нижчим у порівнянні зі значенням цього показника в контролі у 2,2 рази

(рис. 1) для спонтанного ПОЛ та у 2,3 рази для аскорбат-індукованого ПОЛ (рис. 2). При цьому збільшення рівня ТБК-реактивних продуктів через 5 хв інкубації не спостерігається як за умов спонтанного, так і аскорбат-індукованого ПОЛ (рис. 1, 2).

Отримані дані свідчать про спроможність локорину блокувати процеси ПОЛ вже в перші хвилини після початку інкубації. Відомо, що поліфенольні сполуки, які містяться у складі досліджуваних нами екстракту, здатні зв'язувати активні метаболіти кисню, які

є індукторами ПОЛ на ранніх етапах [1]. Спроможність локорину інгібувати аскорбат-індуковане ПОЛ може бути також пов'язана зі зв'язуванням поліфенолами іонів феруму, які необхідні для індукції ПОЛ аскорбатом.

При додаванні до середовища інкубації α -токоферолу накопичення ТБК-реактивних продуктів є також менш вираженим у порівнянні з контролем, але більш вираженим у порівнянні з інкубацією з локорином (рис. 1, 2).

Таким чином, отримані дані свідчать, що екстракт "Локорин"

Таблиця 1

Вплив екстракту "Локорин" та α -токоферолу на деякі показники антиоксидантно-прооксидантного статусу печінки щурів за умов тетрахлорметанового гепатиту ($M \pm m$, $n=28$)

Досліджувані показники	Інтакт	Контроль	$\text{CCl}_4 + \text{локорин}$	$\text{CCl}_4 + \alpha\text{-токоферол}$
Спонтанне ПОЛ, нмоль/г	$3,54 \pm 0,48$	$10,48 \pm 0,67^*$	$5,52 \pm 0,11^{**}/**$	$5,38 \pm 0,27^{**}/**$
Аскорбат-індуковане ПОЛ, нмоль/г	$5,19 \pm 0,29$	$13,70 \pm 1,00^*$	$7,06 \pm 0,49^{**}/**$	$7,34 \pm 0,35^{**}/**$
АГП, нмоль/г	$0,65 \pm 0,05$	$1,5 \pm 0,17^*$	$0,89 \pm 0,07^{**}/**/***$	$0,88 \pm 0,14^{**}/**$
ДК, нмоль/г	$3,01 \pm 0,15$	$6,45 \pm 0,42^*$	$4,13 \pm 0,09^{**}/**$	$4,24 \pm 0,23^{**}/**$
GSH, мкмоль/г	$3,38 \pm 0,21$	$1,92 \pm 0,10^*$	$3,02 \pm 0,20^{**}/**$	$2,85 \pm 0,06^{**}/**$
Катализаза, мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{xv}$ на мг білка	$86,96 \pm 2,55$	$51,4 \pm 3,04^*$	$76,35 \pm 3,3^{**}/**$	$70,7 \pm 4,1^{**}/**$

Примітки:

- 1) * — зміни вірогідні відносно інтакту;
- 2) ** — зміни вірогідні відносно контролю;
- 3) *** — зміни вірогідні відносно α -токоферолу.

Таблиця 2

Антиоксидантна активність екстракту “Локорин” та вітаміну Е на моделі тетрахлорметанового гепатиту у щурів ($M \pm m$, $n=28$)

Група тварин	Вміст ТБК-реактивних продуктів, нмоль/г	Антиоксидантна активність, %
Інтакт	1,80±0,17	-
Контроль	4,5±0,76*	-
CCl ₄ + “Локорин”	2,39±0,36**/**	46,8
CCl ₄ + α-токоферол	2,50±0,07**/**	44,4

Примітки:

- 1) * — зміни вірогідні відносно інтакту;
2) ** — зміни вірогідні відносно контролю.

здатен ефективно блокувати як спонтанну, так і аскорбат-індуковану активацію процесів ПОЛ *in vitro*, що свідчить про його високу антиокиснювальну активність.

У наступній серії дослідів ми вивчали антиоксидантні властивості екстракту “Локорин” на моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту. Ураження печінки тетрахлорметаном — класична модель так званих вільнорадикальних патологій, яка найчастіше застосовується для вивчення антиоксидантних властивостей фармакологічно активних речовин [4]. Високу гепатотоксичність тетрахлорметану пов’язують з його високою розчинністю у ліпідах та накопиченням у гідрофобному шарі біомембрани, а також порушенням структури мембрани за рахунок активації процесів ПОЛ [1, 7]. Згідно з нашими даними (табл. 1, 2) введення щуром CCl₄ призводить до збільшення вмісту у гомогенаті печінки первинних продуктів ПОЛ — дієнових кон’югатів (у 2,1 рази відносно інтакту) та кінцевих продуктів ПОЛ — ацилгідропероксидів і ТБК-реактивних продуктів (у 2,3 та 2,4 рази відносно інтакту відповідно), що свідчить про інтенсифікацію процесів ПОЛ у печінці щурів за умов контролальної патології. Встановлене нами зростання інтенсивності спонтанного (у 3 рази відносно інтакту) та аскорбат-індукованого (у 2,6 разів відносно інтакту) ПОЛ у гомогенаті печінки тварин, яким вводили CCl₄

(табл. 2), свідчить про дестабілізацію клітинних мембрани, що робить їх більш чутливими до індукторів ПОЛ. За умов гострого експериментального гепатиту спостерігається також зниження активності антиоксидантної системи печінки, про що свідчить падіння рівня відновленого глутатіону (у 1,8 рази відносно інтакту) та зниження активності антиоксидантного ферменту — каталази (у 1,6 разів відносно інтакту) у гомогенаті печінки (табл. 2).

Таким чином, за умов гострого тетрахлорметанового гепатиту у печінці спостерігається активація процесів ПОЛ та зниження активності антиоксидантної системи. Останнє узгоджується з даними літератури про ключову роль вільнорадикальних процесів у гепатотоксичності CCl₄ [1, 4].

При введенні щуром екстракту “Локорин” або α-токоферолу на тлі ураження печінки CCl₄ вміст продуктів ПОЛ є суттєво нижчим у порівнянні з контролем (табл. 1, 2), що свідчить про спроможність досліджуваних речовин знижувати інтенсивність процесів ПОЛ за умов контролальної патології. При цьому антиоксидантна активність локорину є такою ж, як у α-токоферолу, а у деяких випадках навіть перевищує її (табл. 1, 2). Висока антиоксидантна активність локорину, очевидно, пов’язана зі спроможністю присутніх у його складі поліфенолів зв’язувати активні метаболіти кисню та продукти ПОЛ.

Введення щуром локорину також як і α-токоферолу приводить до зниження інтенсивності спонтанного та аскорбат-індукованого ПОЛ у печінці щурів за умов контролальної патології (табл. 1). Останнє свідчить про спроможність екстракту “Локорин” стабілізувати клітинні мембрани.

Нами було також встановлено, що введення локорину частково попереджує зниження рівня відновленого глутатіону та каталазної активності у печінці, спричинене введенням тетрахлорметану (табл. 1), що вказує на спроможність досліджуваного екстракту збільшувати активність антиоксидантної системи печінки.

Таким чином, введення щуром екстракту “Локорин” за умов гострого тетрахлорметанового гепатиту суттєво покращує антиоксидантно-прооксидантний статус печінки за рахунок як зниження інтенсивності процесів ПОЛ та стабілізації клітинних мембрани, так і зміцнення антиоксидантної системи захисту.

Взагалі отримані нами дані свідчать про наявність у досліджуваного екстракту “Локорин” потужних антиоксидантних властивостей при дії як *in vitro*, так і *in vivo*. У дослідах *in vitro* встановлено, що антиокиснювальна активність локорину, яка проявляється у його спроможності блокувати спонтанне та аскорбат-індуковане ПОЛ, перевищує антиокиснювальну активність основного антиоксиданта ліпідної фази — α-токоферолу. У дослідах *in vivo* встановлено, що введення щуром локорину у моделі гострого тетрахлорметанового гепатиту значно покращує антиоксидантно-прооксидантний статус печінки, причому його антиоксидантні властивості не поступаються властивостям α-токоферолу.

Отримані дані про потужні антиоксидантні властивості локорину дозволяють висловити припущення, що в основі фармакологічної активності екстракту лежить його спроможність запобігати активації вільнорадикальних процесів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 252 с.
2. Волчегорский И.Ф., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. //Вопр. мед. химии. — 1989. — №1. — С. 127-131.
3. Галузинська Л.В., Набока О.І. //Мед. хімія. — 2005. — Т. 7, №4. — С. 75-76.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекоменд. / За ред. чл.-кор. АМН України О.В.Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — 528 с.
5. Путилина С.Е. Определение содержания восстановленного глутамиона в тканях // В кн.: "Биохимические методы исследования". — М.: Медицина, 1982. — С. 183-185.
6. Романова Л.А., Стальная И.Д. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н.Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 64-66.
7. Стальная И.Д., Гавришвили Т.Г. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н.Ореховича. — М.: Медицина, 1977. — С. 66-68.
8. Чекман І.С. //Фітометерапія в Україні. — 2000. — №2. — С. 3-5.
9. Aicamp J., Gaspar A., Hara Y., Apostolides Z. //Anticancer Res. — 1997. — Vol. 17. — P. 4381-4385.
10. Chen C., Yu R., Owoor E.D., Kong A.N. //Arch. Pharm. Res. — 2000. — Vol. 23. — P. 605-612.
11. Chan M.M., Fong D., Ho C.T., Huang H.I. //Biochem. Pharmacol. — 1997. — Vol. 54. — P. 1281-1286.
12. Dequeker J., Hawkey C., Kahan A. et al. //Br. J. Rheumatol. — 1998. — Vol. 37. — P. 946-951.
13. Guo Q., Zhao B., Shen S. et al. //Biochem. Biophys. Acta. — 1999. — Vol. 1427. — P. 13-23.
14. Hong J., Smith T.J., Ho C.T. et al. //Biochem. Pharmacol. — 2001. — Vol. 62. — P. 1175-1183.
15. Lichtenstein D.R., Syngal S., Wolfe M.M. //Arthritis Rheum. — 1995. — Vol. 38. — P. 5-18.
16. Lin Y.L., Lin J.K. //Mol. Pharmacol. — 1997. — Vol. 52. — P. 465-472.
17. Lin Y.L., Tsai S.H., Lin-Shiau S.Y. et al. //Eur. J. Pharmacol. — 1999. — Vol. 367. — P. 379-388.
18. Middleton E.Jr. //Adv. Exp. Med. Biol. — 1998. — Vol. 439. — P. 175-182.
19. Murklund S., Nordensson J., Back O. //J. Gerontol. — 1981. — Vol. 36, №4. — P. 405-409.
20. Nakagawa T., Yokozawa T. //Food Chem. Toxicol. — 2002. — Vol. 40. — P. 1745-1750.
21. Nanjo F., Honda M., Okushio K. et al. //Biol. Pharm. Bull. — 1993. — Vol. 16. — P. 1156-1159.
22. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. //Trends Plant Sci. — 1997. — Vol. 2. — P. 152-159.
23. Sur-Altiner D., Yenice B. //Drug Metabol. Drug Interact. — 2000. — Vol. 16. — P. 123-128.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (057) 706-30-99.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 02.02.2006 р.