УДК 615.243:616.33-002.44:615.451.16:665.335.82:577.352.24

А. О. Мінаєва, Н. М. Кононенко

Національний фармацевтичний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИРАДИКАЛЬНИХ ТА МЕМБРАНОСТАБІЛІЗУВАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЕМУЛЬСІЇ ЛІПОСОМ З ПОЛІФЕНОЛАМИ ВИНОГРАДНОГО НАСІННЯ

Метою роботи було вивчення антирадикальних і мембранопротекторних властивостей наноемульсії ліпосом з поліфенолами виноградного насіння (НЛПВН). У результаті проведених досліджень встановлено, що НЛПВН має виражені антирадикальні властивості в умовах in vitro по відношенню до генерації гідроксильного та супероксидного аніон-радикалів та зменшує гемоліз інтактних еритроцитів на 74 %, що свідчить про наявність у наноемульсії мембранопротекторних властивостей.

Ключові слова: ліпосоми; полі феноли; вільнорадикальне окиснення; антирадикальна активність; мембраностабілізувальна активність

ВСТУП

Відомо, що багато патологічних процесів як загально патологічних, так і органоспецифічних є спільні патогенетичні ланки, які реалізуються на клітинному та субклітинному рівні завдяки єдиним універсальним механізмам деструкції тканини. Зокрема, прикладом таких патологічних процесів є запалення, активація процесів вільнорадикального окиснення (ВРО) (на сьогодні відомо понад 100 ВРО-обумовлених патологій різної локалізації), деструкція клітинних мембран та лізис їх органел, порушення процесів синтезу білка та, як результат, пригнічення регенерації і відновлення функції пошкодженої тканини [4, 5, 6]. До хвороб, що розвиваються на тлі вищеназваних процесів, можна віднести запальні захворювання різної локалізації, виразкові процеси шкіри і слизових оболонок та ін. [2].

З огляду на це терапія багатофакторних патологічних станів повинна також включати комплексний вплив на різні патогенетичні механізми одночасно. В цьому аспекті перспективними можуть бути лікарські препарати рослинного походження, що чинять полівалентну терапевтичну дію, а також мінімальну токсичну дію на організм. Важливе місце серед природних антиоксидантів посідають компоненти поліфенольної природи [1, 7].

У НФаУ було створено новий лікарський препарат у вигляді наноемульсії ліпосом, які містять поліфеноли виноградного насіння (НЛПВН). У попередніх дослідженнях були встановлені гастропротекторні властивості НЛПВН на різних моделях виразкового ураження шлунка.

Оскільки внаслідок активації ВРО, в першу чергу, порушується структура та функції мембранного апарату клітини, а також враховуючи дані літератури про мембранотропні властивості поліфенолів, метою нашої роботи було вивчення антирадикальних і мембранопротекторних властивостей НЛПВН, які можуть бути важливою складовою механізму їхньої дії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Антирадикальну активність НЛПВН щодо генерації супероксидного аніон-радикалу визначали в умовах in vitro за методом Misra H. P., Fridovich I. [9]. Метод заснований на визначенні ступеня гальмування реакції відновлення нітротетразолію синього супероксидними радикалами, що генеруються в ксантиноксидазній системі. Дослідження проводили в середовищі, що містить 50 мМ K^+,Na^+-фосфатного буферу (pH 7,8), 50 мМ натрію карбонату, 0,1 мМ ЕДТА, 25 мкМ нітротетразолію синього, 0,1 мМ ксантину, 0,003 од/мл ксантиноксидази. Дані реєстрували при 560 нм на спектрофотометрі «Specord UV VIS» (Німеччина).

Антирадикальну активність по відношенню до інактивації гідроксильних радикалів оцінювали за здатністю НЛПВН гальмувати руйнування дезоксирибози гідроксильним радикалом, який генерується модельною системою Fe-ЕДТА + пероксид водню + аскорбат [8]. Реакційне середовище містило: 24 мМ K^+,Na^+-фосфатного буферу, 1 мМ H_2O_2, 100 мМ $FeCl_3$, 104 мМ ЕДТА, 100 мМ аскорбінової кислоти, 2,8 мМ

© Мінаєва А. О., Кононенко Н. М., 2014

дезоксирибози. Проби інкубували при 37 °С впродовж 15 хвилин. Потім додавали ТБК-реагент (0,5 % розчин 2-тіобарбітурової кислоти в 0,3 % розчині додецилсульфату натрію). Суміш інкубували на водяній лазні впродовж 15 хв. У результаті реакції окиснення дезоксирибози утворюються продукти, здатні реагувати з тіобарбітуровою кислотою, кількість яких визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 532 нм. Антирадикальну активність визначали за відсотком гальмування реакції руйнування дезоксирибози.

При визначенні антирадикальної активності в умовах in vitro НЛПВН додавали в широкому діапазоні концентрації: при вивченні антисупероксидрадикальної активності – 0,01-5,00 мкг/мл, при вивченні антигідроксильної активності – 300-2400 мкг/мл.

Досліди проведені в порівнянні з відомим прямим антиоксидантом – кверцетином: у концентраціях 0,01-0,50 мкг/мл при дослідженні дії на генерацію супероксиду, в концентрації 300-2100 мкг/мл – при генерації гідроксилу.

Зважаючи на уніфікованість будови мембран усіх клітин, еритроцити є найбільш зручною моделлю, що використовується в фармакології для вивчення мембранопротекторних властивостей лікарських препаратів.

Мембраностабілізувальну дію НЛПВН вивчали на моделі спонтанного гемолізу за F. C. Jager, який заснований на вимірюванні концентрації позаеритроцитарного гемоглобіну, що надходить у сироватку крові внаслідок лізису мембран еритроцитів, викликаного перекисним окисненням ліпідів киснем повітря [3]. НЛПВН у дозі 90 мг/кг і препарати порівняння – кверцетин та вітамін Е у дозах 50 мг/кг і 10 мг/кг відповідно вводили внутрішньошлунково інтактним щурам щоденно одноразово протягом трьох днів до вивчення гемолізу.

Для визначення мембранопротекторної активності у дослідних тварин брали кров із хвостової вени та вимірювали ступінь гемолізу в дослідній і контрольній групах спектрофотометрично при довжині хвилі 540 нм. Мембраностабілізувальну активність розраховували за формулою:

$$A_м = \frac{X\ досл. \times 100}{X\ контр.},$$

де: $A_м$ – мембраностабілізувальна активність, %;
X досл. і X контр. – ступінь гемолізу у тварин дослідної та контрольної групи, відповідно.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведеного експерименту з визначення антирадикальної активності НЛПВН та кверцетину відносно супероксидного аніон-радикалу встановлено, що НЛПВН має високу антирадикальну дію (табл. 1): у концентрації 0,5 мкг/мл гальмування реакції утворення супероксидного аніон-радикалу сягало 36,4 %, в той час як максимальна активність кверцетину становила 25,0 % у дозі 0,1 мкг/мл, що було на 11,4 % менше, ніж під впливом НЛПВН.

Таблиця 1

ВИВЧЕННЯ АНТИРАДИКАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НЛПВН В УМОВАХ IN VITRO ВІДНОСНО СУПЕРОКСИДНОГО АНІОН-РАДИКАЛУ ($X \pm S_X$, n = 6)

Концентрація, мг/мл	Гальмування реакції утворення супероксидного аніон-радикалу, %	
	НЛПВН	кверцетин
0,01	< 1	9,6 ± 0,8
0,05	8,5 ± 0,4	17,2 ± 1,0
0,10	16,3 ± 0,6	25,0 ± 0,9
0,20	29,1 ± 1,2	12,6 ± 0,7
0,50	36,4 ± 1,0	< 1
1,00	20,0 ± 1,4	–
2,00	7,6 ± 0,3	–
5,00	< 1	–
7,50	–	–

Примітка: «–» – дослід не проводився.

Крім того, діапазон концентрацій, у яких спостерігалася антирадикальна дія НЛПВН, також був найбільшим: від 0,05 мкг/мл (8,5 %) до 2,0 мкг/мл (7,6 % – мінімальна активність), тобто граничні концентрації відрізняються одна від одної у 40 разів. Діапазон активності препарату порівняння кверцетину був дещо меншим та вужчим: 0,01-0,20 мкг/мл. Слід відмітити, що зміна інтенсивності антирадикальної дії НЛПВН, як і кверцетину, мала дозозалежний нелінійний характер, спочатку підвищуючись, а потім зменшуючись.

Стосовно ж гальмуючого впливу НЛПВН на реакцію утворення гідроксильного радикалу доведено (табл. 2), що наноемульсія пригнічувала вільнорадикальне руйнування дезоксирибози в діапазоні концентрацій 300-2100 мкг/мл, виявивши максималь-

Таблиця 2

ВИВЧЕННЯ АНТИРАДИКАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НЛПВН В УМОВАХ IN VITRO ВІДНОСНО ГІДРОКСИЛЬНОГО РАДИКАЛУ ($X \pm S_X$, n = 6)

Концентрація, мг/мл	Гальмування реакції утворення гідроксидного радикалу, %	
	НЛПВН	кверцетин
300	12,6 ± 1,1	< 1
600	33,9 ± 1,5	25,8 ± 1,3
900	62,5 ± 2,4	57,1 ± 2,9
1200	81,7 ± 1,9	62,0 ± 2,1
1500	69,3 ± 2,0	31,2 ± 1,5
1800	32,0 ± 1,8	12,6 ± 1,9
2100	18,3 ± 1,6	< 1
2400	< 1	–

Примітка: «–» – дослід не проводився.

Таблиця 3

ВИВЧЕННЯ МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НЛПВН НА МОДЕЛІ СПОНТАННОГО ГЕМОЛІЗУ ($X \pm S_X$, n = 6)

Умови досліду	Відсоток гемолізу, %	Мембранопротекторна активність, %
Інтактний контроль	15,80 ± 1,0	–
НЛПВН	4,10 ± 0,5 *	74,05
Вітамін Е	5,80 ± 0,2 *	63,30
Кверцетин	7,05 ± 0,3 */**	55,40

Примітки: * – $p \leq 0,05$ відносно інтактного контролю;
** – $p \leq 0,05$ відносно впливу вітаміну Е.

ну активність у концентрації 1200 мкг/мл (81,7 %). У близькому діапазоні концентрацій було зафіксовано також дію препарату порівняння – кверцетину, що чинив помітну антирадикальну дію в концентрації 600 мкг/мл (25,8 %), поступово збільшуючи її та залишаючись високоактивним у концентраціях 900 та 1200 мкг/мл (57,1 % та 62 %, відповідно). З подальшим підвищенням концентрації збільшення активності не спостерігалося, навпаки, вона поступово зменшувалася та зникала у концентрації 2100 мкг/мл.

Отже, в результаті вищеописаної серії дослідів доведено, що антирадикальна дія НЛПВН по відношенню до генерації гідроксильного радикалу виявлена в однаковій з кверцетином концентрації (1200 мкг/мл), все ж була на 19,7 % вищою за дію препарату порівняння, хоча необхідно відмітити, що останній також чинив значний ефект.

Таким чином, НЛПВН чинить сильний антирадикальний ефект in vitro, причому здатність НЛПВН (як і препарату порівняння) інактивувати утворення гідроксильного радикалу була більш вираженою в порівнянні з впливом на реакцію генерації супероксидного аніон-радикалу.

У наступній серії дослідів нами було досліджено здатність НЛПВН стабілізувати мембрани неушкоджених еритроцитів.

У ході досліду встановлено, що НЛПВН та вітамін Е мають максимальну мембраностабілізувальну активність 74,05 % та 63,30 % відповідно (табл. 3). Ефективність кверцетину склала 55,4 %. Отримані дані свідчать про наявність мембранопротекторних властивостей у НЛПВН, більш виражених порівняно з вітаміном Е та кверцетином.

ВИСНОВКИ

1. НЛПВН має виражені антирадикальні властивості в умовах in vitro по відношенню до генерації гідроксильного та супероксидного аніон-радикалів, що перевершує здатність інактивувати активовані кисневі метаболіти препарату порівняння – кверцетину.
2. НЛПВН зменшує гемоліз інтактних еритроцитів на 74 %, що свідчить про наявність у наноемульсії мембранопротекторних властивостей, що перевершує здатність стабілізувати клітинні мембрани вітаміну Е та кверцетину на 10,75 % та 18,65 % відповідно.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Бизунок Н. А. Структурные детерминанты антиоксидантной активности производных фенола, дифенола и полифенолов в отношении активных форм кислорода, генерируемых макрофагами в различных условиях микроокружения / Н. А. Бизунок // Военная медицина. – 2013. – № 1 (26). – С. 84-94.
2. Боев В. М. Свободнорадикальное окисление в оценке риска здоровья / [В. М. Боев, С. И. Красиков, Н. В. Свистунова и др.] // Гигиена и санитария. – 2006. – № 5. – С. 19-20.
3. Карбушева І. В. Експериментальне вивчення фармакологічної ефективності нового поліфенольного препарату альтану при виразкових колітах: [автореф. дис. канд. біол. наук] / І. В. Карбушева. – Одеса, 2002. – 17 с.
4. Лущак В. И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма (обзор) / В. И. Лущак // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 8. – С. 995-1017.
5. Фархутдинов Р. Р. Свободнорадикальное окисление: мифы и реальность (избранные лекции) / Р. Р. Фархутдинов // Мед. вестник Башкортостана. – 2006. – Т. 1, № 1. – С. 146-152.
6. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function / W. Dröge Physiol. Rev. – 2002, Jan. – 82 (1). – P. 47-95.
7. Fikselová M. Antioxidant (antiradical) and antimicrobial (antifungal) efects of slovak tokaj wines / M. Fikselová, M. Kačániová, M. Mellen // Acta Alimentaria. – 2010. – T. 39, № 3. – C. 256-264.
8. Halliwell B. The deoxyribose method: a simple "test-tubs" assay for determination of rate constants of hydroxyl radically / B. Halliwell, J. M. C. Gutteredge, O. I. Aruoma // Anal. Biochem. – 1987. – Vol. 165, № 1. – P. 215-219.
9. Misra H. P. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase / H. P. Misra, I. Fridovich // J. Biol. Chem. – 1972. – Vol. 247, № 10. – P. 3170-3175.

УДК 615.243:616.33-002.44:615.451.16:665.335.82:577.352.24

А. А. Минаева, Н. Н. Кононенко

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИРАДИКАЛЬНЫХ И МЕМБРАНОСТАБИЛИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ НАНОЭМУЛЬСИИ ЛИПОСОМ С ПОЛИФЕНОЛАМИ ВИНОГРАДНЫХ СЕМЯН

Целью данной работы было изучение антирадикальных и мембранопротекторных свойств наноэмульсии липосом с полифенолами виноградных семян (НЛПВС). В результате проведенных исследований установлено, что НЛПВС обладает выраженным антирадикальным действием в условиях in vitro по отношению к генерации гидроксильного и супероксидного анион-радикалов и уменьшает гемолиз интактных эритроцитов на 74 %, что свидетельствует о наличии в наноэмульсии мембранопротекторных свойств.

Ключевые слова: липосомы; полифенолы; свободнорадикальное окисление; антирадикальная активность; мембраностабилизирующая активность

UDC 615.243:616.33-002.44:615.451.16:665.335.82:577.352.24

A. O. Minaieva, N. M. Kononenko

RESEARCH OF ANTIRADICAL AND MEMBRANE STABILIZING PROPERTIES OF THE NANOEMULSION OF LIPOSOMES WITH GRAPE SEEDS POLYPHENOLS

The aim of this study was to investigate antiradical and membrane activities of the nanoemulsion of liposomes with grape seed polyphenols (NLGSP), that can be an important part of their mechanism of action. As a result of the studies it has been found that the NLGSP has pronounced antiradical activities in vitro conditions relative to the generation of hydroxyl and superoxide anion radicals and reduces hemolysis of intact red blood cells by 74 %, what indicates the presence of the nanoemulsium membrane protective activity.

Key words: liposomes; polyphenols; free radical oxidation; antiradical activity; membrane stabilizing activity

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.
Тел. 099-55-98-958. E-mail: 12345alina@gmail.com.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 07.04.2014 р.