

УДК 615.32:54.06:678.048

Шульга Л.І.

Національний фармацевтичний університет

Антиоксидантний профіль нового рослинного засобу – дослідження на модельних системах *in vitro*

Представлено результати з вивчення антиоксидантної (антисупероксидної, антирадикальної, хелатуючої) активності складної настойки методами *in vitro*. Висунуто припущення щодо механізму антиоксидантної дії, що реалізується за рахунок участі біологічно активних речовин, серед яких фенольні сполуки, у зв'язуванні іонів Fe^{2+} , інгібуванні утворення гідроксил-радикалу $OH\cdot$ і супероксидного аніон-радикалу $O_2^{\cdot-}$.

Ключові слова: дослідження *in vitro*, антиоксидантна активність, фенольні сполуки, складна настойка

Протягом останніх десятиріч увагу клініцистів зосереджено на вдосконаленні тактики надання медикаментозної терапії при стоматологічних захворюваннях, зокрема запальних хворобах пародонту та слизової оболонки порожнини рота. При використанні існуючих лікувально-профілактичних засобів не відмічається тенденції до зменшення їх кількості, що свідчить про необхідність і своєчасність активізації нових розробок [5-7].

У патогенезі захворювань пародонту запального характеру важливе значення, за даними вітчизняних та закордонних вчених, відводиться процесам перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що обґрунтовує патогенетичну доцільність включення до комплексу лікувальних заходів запальних захворювань ротової порожнини потужних антиоксидантів природного та синтетичного походження для посилення антиоксидантного захисту й уповільнення вільнорадикальної активності [4, 15, 24].

На кафедрі загальної фармації та безпеки ліків ІПКСФ НФаУ під керівництвом д. фарм. н., проф. Пімінова О.Х. розроблено склад і технологію одержання складної настойки під умовною назвою «Касдент» [9]. Проведеним біологічним вивченням доведено мембранопротекторний ефект, встановлено наявність вираженої антимікробної й антифунгальної активностей розробленого лікарського фітозасобу по відношенню до музейних і клінічних штамів грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів і грибів роду *Candida* [3, 21]. Фітохімічними дослідженнями одержано уявлення щодо спектру біологічно активних сполук рідкої лікарської форми, а саме: встановлено присутність летких речовин, вільних і зв'язаних амінокислот, фенольних сполук, жирних кислот [10-12, 21].

На цей час накопичено вагомий експериментальний матеріал, що свідчить про взаємозв'язок антиоксидантної активності (АОА) фенольних сполук з їх структурою, а також здатність флавоноїдів зв'язувати іони важких металів — каталі-

заторів окисних процесів з утворенням стійких комплексів або взаємодіяти з високоактивними вільними радикалами, виступати донорами атома водню, зупиняючи ланцюг окисних реакцій, виявляти антирадикальну активність [1, 2, 8, 14, 16, 18-20, 23].

Встановлення перелічених властивостей доповнило би фармакотерапевтичну цінність рослинного стоматологічного засобу, оскільки нормалізація антиоксидантного захисту організму за допомогою препаратів з антиоксидантним потенціалом — перспективний напрямок комплексної терапії хворих із запальними станами пародонту.

Метою даної роботи є дослідження на модельних системах *in vitro* антисупероксидної, антирадикальної та хелатуючої дії для зв'язування антиоксидантного профілю та припущення механізму АОА настойки «Касдент».

Матеріали та методи

Об'єкт дослідження — фітозасіб під умовною назвою «Касдент». Як препарат порівняння обрано рідкий рослинний лікарський засіб «Стоматофіт» («Фітофарм Кленка С.А.», Польща), що широко застосовується клініцистами у стоматології.

Дослідження із визначення антиоксидантних властивостей методами *in vitro* [17, 22] проводили в лабораторії біохімії ДУ «Інститут стоматології АМН України» (м. Одеса) під керівництвом д.б.н. Макаренко О.А.

Вміст фенольних сполук (мг/мл), у перерахунку на рутин, у досліджуваній настойці та препараті «Стоматофіт» визначали на спектрофотометрі UV mini-1240 («Shimadzu», Японія) у кварцових кюветах з товщиною шару 1 см за довжини хвилі $\lambda = 750$ нм, використовуючи реактив Фоліна. Вміст суми флавоноїдів (мг/мл), у перерахунку на рутин, встановлювали спектрофотометричним методом ($\lambda = 410.5$ нм) за реакцією утворення комплексу флавоноїдів зі спиртовим розчином алюмінію хлориду.

Антисупероксидну активність (АСА) (од/мл) досліджуваних об'єктів визначали спектрофотометричним методом ($\lambda = 560$ нм) за здатністю фенольних сполук конкурувати з тетразолієвим синім у реакції відновлення супероксидних радикалів (O_2^{-1}).

Антирадикальну активність (АРА) (од/мл) (гальмування утворення ОН) оцінювали спектрофотометрично за довжини хвилі 520 нм за здатністю об'єктів дослідження віддавати рухомий атом водню або електрон вільному радикалу дифенілпікрілгідразу, що супроводжується зниженням оптичної густини.

Хелатуючу активність (ХА) (од/мл) визначали спектрофотометричним методом ($\lambda = 560$ нм) із ферозинном (DAS-SpectroMed S.R.L., Молдова), враховуючи властивість рослинних засобів зв'язувати іони Fe^{2+} .

Для кожного з об'єктів проводили розрахунки одержаних даних АСА, АРА, ХА відносно вмісту флавоноїдів та фенольних сполук: АСА/флавоноїди, АСА/фенольні сполуки, АРА/флавоноїди, АРА/фенольні сполуки та ХА/флавоноїди, ХА/фенольні сполуки та порівнювали визначені показники.

Статистичну обробку одержаних значень проводили відповідно до вимог ДФУ [25].

Результати досліджень та їх обговорення

Результати визначення вмісту флавоноїдів і загального вмісту фенольних сполук у складній настійці та препараті «Стоматофіт» представлено у Таблиці. Аналізуючи одержані результати слід відзначити, що вміст флавоноїдів і фенольних сполук у настійці порівняно зі Стоматофітом дещо бідніший: концентрація флавоноїдів в 1.45 рази, а загальний вміст фенольних сполук в 1.7 рази нижчий.

Здатність біологічно активних речовин рослинних засобів пригнічувати продукцію

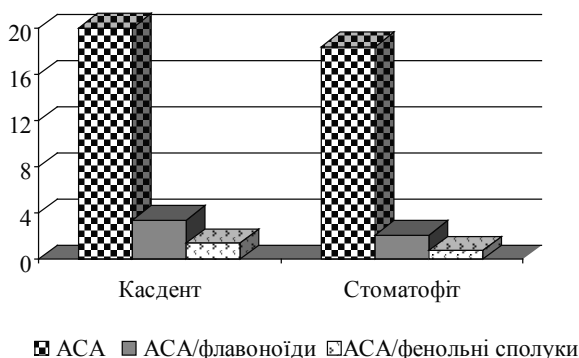
супероксиданіон-радикалів та гідроксил-радикалів відображено на Рис. 1 та Рис. 2.

Дослідженнями антиоксидантних властивостей *in vitro* (Рис. 1 і Рис. 2) виявлено, що біологічно активні сполуки, переважно флавоноїди та фенольні сполуки настійки «Касдент», пригнічують продукцію супероксиданіон-радикалів на рівні, а гідроксил-радикалів більше, ніж відповідні діючі речовини препарату «Стоматофіт».

Встановлено, що параметри АСА/флавоноїди та АРА/флавоноїди вище для настійки. Отже, флавоноїди настійки більш активні у порівнянні із флавоноїдами Стоматофіту щодо АСА в 1.6 рази, АРА – в 1.77 рази. Фенольні речовини настійки також виявилися більш активними антиоксидантами, ніж відповідні сполуки Стоматофіту. Так, АСА фенольних сполук настійки в 1.87 раз вище АСА фенольних сполук Стоматофіту, а значення відношення АРА/фенольні сполуки розробленого засобу до відповідного параметру Стоматофіту дорівнює 2.1.

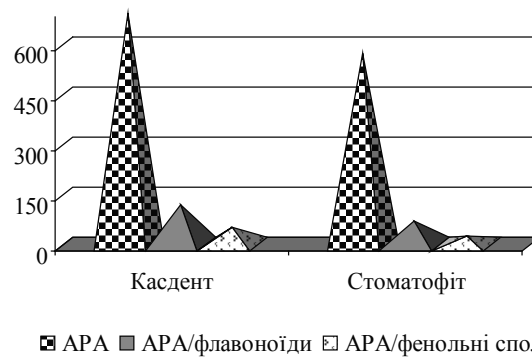
Супероксид-радикал – радикал, що виявляє високу активність і може реагувати із ДНК, білками, мембранами, пошкоджуючи їх. Даний радикал, оточений молекулами води, – основа для утворення інших активних форм кисню (гідроксил-радикалу, азоту діоксиду, водню пероксиду), оскільки, опинившись усередині клітини, він не може подолати мембрану. Гідроксил-радикал, одержаний відновленням із водню пероксиду, виявляє потужну реакційну здатність, спроможність окиснювати будь-яку речовину клітини [4, 13]. У зв'язку з цим, можливість інактивувати гідроксильні радикали – один із важливих показників активності антиоксиданта. Таким чином, виявлення антисупероксидних і антирадикальних властивостей розробленої настійки «Касдент» – вагома позитивна характеристика її антиоксидантного профілю.

Рисунок 1



Антисупероксидна активність досліджуваних препаратів

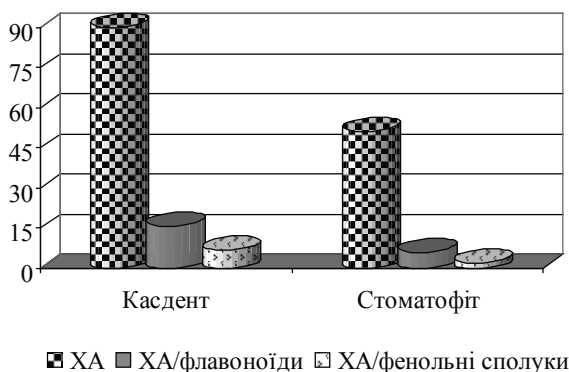
Рисунок 2



Антирадикальна активність досліджуваних препаратів

На Рис. 3 наведено результати вивчення хелатуючих властивостей досліджуваних лікарських засобів. Показано, що біологічно активні речовини Касденту та Стоматофіту на модельних системах *in vitro* виявляли здатність зв'язувати іони Fe²⁺, а саме - у присутності іонів металів відбувається ініціювання процесів ПОЛ.

Рисунок 3



Хелатуючі властивості досліджуваних препаратів

Таким чином, антиоксиданти, яким притаманні хелатуючі властивості, здатні обривати ланцюг каскадних реакцій і запобігати функціональним і структурним порушенням, викликаним продуктами ПОЛ.

За даними, наведеними на Рис. 3, відзначали найбільш виражені відмінності значень досліджуваних параметрів. Значення ХА фітозасобу «Касдент» майже у 2 рази вище за значення ХА препарату порівняння. Параметр ХА/флавоноїди вище для розробленої настойки (у 2.65 рази). Хелатуюча здатність фенольних сполук настойки (ХА/фенольні сполуки) більше ніж у 3 рази вища, ніж фенольних сполук Стоматофіту.

Одержані результати дозволили доповнити уявлення щодо складу біологічно активних речовин настойки, зокрема флавоноїдів та інших фенольних сполук, та її антиоксидантних властивостей.

Виходячи із отриманих даних, флавоноїди та фенольні сполуки фітозасобу під умовною назвою «Касдент» можна віднести до потужних антиоксидантних агентів, що виявляють

значну антисупероксидну, антирадикальну та хелатуючу реакційну здатність. Вищенаведене підкреслює виправданість очікування ефективності при застосуванні настойки у терапевтичній стоматології для усунення ряду патологій, що супроводжуються спалахом вільнорадикальних процесів.

Висновки

На модельних системах *in vitro* досліджено антиоксидантні властивості (антисупероксидну, антирадикальну та хелатуючу дії) складної настойки під умовною назвою «Касдент» та лікарського засобу «Стоматофіт».

Встановлено антиоксидантний профіль розробленого фітозасобу – наявність антиоксидантної дії на стадії утворення активних форм кисню, таких як пошкоджуючий супероксидрадикал, здатність гальмувати сильний окисник – гідроксильний радикал та зв'язувати іони Fe²⁺.

Одержані результати є підставою вважати рослинний засіб «Касдент» потенційним антиоксидантним агентом, що зможе пригнічувати або інактивувати процеси вільнорадикального окинлення, тим самим перешкоджаючи подальшому перебігу запальних процесів у ротовій порожнині.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антиоксидантні свойства некоторых природных биофлавоноидов / О.А. Макаренко, А.П. Левицкий, В.И. Литвиненко, И.В. Ходаков // Вісник ОНУ. – 2010. – Т. 15, № 6. – С. 15-21.
2. Бориков О.Ю. Антиоксидантна активність представників різних класів флавоноїдів *in vitro* / О.Ю. Бориков // Вісник фармації. – 2010. – № 3. – С. 73-75.
3. Вивчення мембраностабілізуючої активності рослинного лікарського засобу / Л.І. Шульга, О.А. Щербак, Л.М. Малоштан, О.Ф. Пімінов // Фармацевтичний часопис. – 2011. – № 3. – С. 99-101.
4. Демкович А.Є. Активні форми кисню в механізмах розвитку і перебігу запальних процесів одонтогенного походження / А.Є. Демкович // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2012. – № 1. – С. 51-54.
5. Експериментальні дослідження впливу Фламікару та кораргіну, які іммобілізовані на силіксі, на ліпопероксидацію в пародонті щурів / Ю.І. Губський, А.В. Юрженко, Т.С. Брюзгіна, В.М. Барвінченко // Буковинський медичний вісник. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 98-101.

Таблиця

Вміст флавоноїдів, фенольних сполук та антиоксидантна активність досліджуваних лікарських засобів

Об'єкт дослідження	Вміст (мг/мл)		Антиоксидантна активність (од/мл)		
	флавоноїди	фенольні сполуки	АСА	АРА	ХА
Касдент	5.9±0.3	13.9±1.1	20.3±1.4	691.8±63.2	93.2±3.5
Стоматофіт	8.6±0.5	23.6±1.8	18.4±0.9	570.4±45.8	51.3±5.2

Примітка.
n=6.

6. Зубачик В.М. Вплив зубних еліксирів з вмістом екстракту цитрусових на стан антиоксидантної та прооксидантної систем ясен і сироватки крові щурів при перекисному пародонтиті / В.М. Зубачик, І.П. Дзуліт, А.П. Левицький // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. — 2008. — № 4. — С. 40-44.
7. Левицький А.П. Порівняльна гіпоглікемічна і антиоксидантна ефективність препаратів з поліфенолами при експериментальному діабеті II типу / А.П. Левицький, Ю.В. Цісельський // *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. — 2009. — № 2. — С. 7-10.
8. Луценко Ю.О. Визначення кількісного вмісту суми поліфенолів у листі пляща звичайного / Ю.О. Луценко, І. Маглавська, Р.Є. Дармограй // *Клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація*. — 2010. — № 1-2. — С. 85-87.
9. Пат. 66282 Україна, МПК А61К 6/00. Фармацевтична композиція «Касдент» з антимікробною та антифунгальною дією: Пат. 66282 Україна, МПК А61К 6/00 Л.І. Шульга, О.Ф. Пімінов, Т.П. Осолодченко. — №и 201107930; Заявл. 23.06.2011; Опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24.
10. Фенольные соединения новой растительной композиции и ее антиоксидантный потенциал / Л.И. Шульга, А.П. Левицкий, А.Ф. Пиминов, О.А. Макаренко // *Вісник стоматології*. — 2012. — № 7. — С. 43-44.
11. Шульга Л.І. Дослідження амінокислотного складу настійки комплексної дії / Л.І. Шульга // *Фітотерапія*. Ча-сопис. — 2012. — № 1. — С. 70-73.
12. Шульга Л.І. Хромато-мас-спектрометричний аналіз компонентного складу легкої фракції настійки «Касдент» / Л.І. Шульга, В.С. Кисличенко, О.Ф. Пімінов // *Український медичний альманах*. — 2011. — Т. 4, № 4. — С. 186-189.
13. Burda S. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids / S. Burda, W. Oleszek // *J. Agric. Food Chem.* — 2001. — Vol. 49, № 6. — P. 2774-2779.
14. Croft K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids / K.D. Croft // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1998. — Vol. 854. — P. 435-442.
15. Free radical scavenging activity of Taiwanese native plants / W.C. Hou, R.D. Lin, K.T. Cheng et al. // *Phytomedicine*. — 2003. — Vol. 10. — P. 170-175.
16. Importance of flavonoids in therapeutics / T. Shohaib, M. Shafique, N. Dhanya et al. // *H. J. D. Med.* — 2011. — Vol. 3, № 1. — P. 1-18.
17. Nadaroglu H. Antioxidant and radical scavenging properties of *Iris Germanica* / H. Nadaroglu, Y. Demir, N. Demir // *Хим.-фарм. журнал*. — 2007. — Т. 41, № 8. — С. 13-18.
18. Noguchi C. Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drugs for atherosclerosis / C. Noguchi, E. Nikki // *Free Radical Biol. Med.* — 2000. — Vol. 28. — P. 1538-1546.
19. Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants / P.G. Pietta // *J Nat. Prod.* — 2000. — Vol. 63. — P. 1035-1042.
20. Seyoum A. Structure-radical scavenging relationships of flavonoids / A. Seyoum, K. Asres, F.K. El-Fiky // *Phytochemistry*. — 2006. — Vol. 67. — P. 2058-2070.
21. Shulga L.I. Correlation of the structural peculiarities of bioactive compounds of herbal remedy and its pharmacological value / L.I. Shulga // *Annals of Mechnikov Institute*. [Електронний ресурс]. — 2012. — № 2. — P. 71-75.
22. Singleton V.L. Analysis of total phenols and oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos // *Methods Enzymol.* — 1999. — Vol. 299. — P. 152-177.
23. Talcott S.T. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of muscadine wine and juice / S.T. Talcott, J.H. Lee // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. — 2002. — Vol. 50. — P. 3186-3192.
24. Young I.S. Antioxidants in health and disease / I.S. Young, J.V. Woodside // *J. Clin. Pathol.* — 2001. — Vol. 54, №3. — P.176-186.
25. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Харків: ПІРЕГ, 2001. — Доповнення 1. — 2004. — 520 с.

Резюме

Шульга Л.И.

Антиоксидантный профиль нового растительного средства – исследования на модельных системах *in vitro*

Представлены результаты изучения антиоксидантной (антисупероксидной, антирадикальной, хелатирующей) активности сложной настоек методами *in vitro*. Выдвинуто предположение о том, что механизм антиоксидантного действия реализуется за счет участия биологически активных веществ, среди которых фенольные соединения, в связывании ионов Fe^{2+} , в ингибировании образования гидроксил-радикала $OH\cdot$ и супероксидного анион-радикала $O_2^{\cdot-}$.

Ключевые слова: исследования *in vitro*, антиоксидантная активность, фенольные соединения, сложная настойка

Summary

Shulga L.I.

Antioxidant profile of the new plant drug - a study on *in vitro* model systems

Data on the study of antioxidant (antisuperoxidizing, anti-radical, chelating) effect of complex tincture using *in vitro* methods. The assumption on the mechanism of antioxidant effect, implemented through the participation of biologically active compounds, including phenolic compounds in Fe^{2+} binding ions, inhibiting the formation of $OH\cdot$ hydroxyl radical and $O_2^{\cdot-}$ superoxide anion radical has been put forward.

Key words: methods *in vitro*, antioxidant effect, phenolic compounds, complex tincture.

Шульга Людмила Іванівна. Закінчила Українську фармацевтичну академію (1995). К.фарм.н. (2003). Доцент (2006). Доцент кафедри загальної фармації та безпеки ліків ІПКСФ НФаУ.