УДК 615.276

АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ КОМПЛЕКСІВ, ВИЛУЧЕНИХ З ТРАВИ ЧЕБРЕЦЮ

Беленічев І.Ф., Батура Н.Р., Толок А.Я., Омельянчик Л.О.

Останнім часом було встановлено, що в патогенезі запалення найважливішою ланкою є активація вільнорадикального окислення (ВРО) на початкових етапах метаболізму арахідонової кислоти [1]. Даний факт логічно припускає як включення антиоксидантів в комбіновані протизапальні препарати, так і пошук можливостей створення речовин, які поєднуватимуть у собі протизапальні та антиоксидантні властивості.

Здатність гальмувати ВРО характерна для фенольних сполук. Однак синтетичні феноли легко піддаються автоокисленню з утворенням нових вільних радикалів, які викликають ураження клітин [2], тому велике значення набуває пошук антиоксидантів природного походження.

Відомо, що антиоксидантні властивості притаманні різним групам рослинних фенолів [3]. У цьому плані нас зацікавили рослини роду чебрець, які мають багатий склад вторинних метаболітів фенольної та терпеноїдної природи [4], відповідні за даний вид активності [2].

Виходячи з цього, нами була проведена оцінка антиоксидантної активності (АОА) експериментальних фракцій, вилучених з трави чебрецю.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктом дослідження були водо- (ВК) та спирторозчинний (СК) комплекси, екстраговані по раніше розробленій нами методиці комплексного використання трави чебрецю [5].

ВК уявляє собою рідину коричневого кольору з характерним запахом, яка має густину ≈ 1,013 г/мл. Водний комплекс, екстрагований з 100 г абсолютно сухої сировини, містить: сухого залишку 24.210 ± 0.199 г, простих фенолів - 0.226 ± 0.004 г, поліфенольних сполук, які здатні окислюватися перманганатом калію, 6.531 ± 0.098 г.

СК - рідина зелено- коричневого кольору з запахом етанолу, яка має густину ≈ 0.85 г/мл. Спиртовий комплекс, вилучений з 100 г абсолютно сухої сировини, містить: сухого залишку 5.654 ± 0.093 г, простих фенолів - 0.216 ± 0.004 г, поліфенольних сполук, які здатні окислюватися перманганатом калію, 1.480 ± 0.046 г.

Методи оцінки АОА in vitro згідно з механізмом ініціювання вільнорадикального окислення (ВРО) розподіляються на дві групи: методи оцінки при ферментативному ініціюванні ВРО і методи оцінки при неферментативному ініціюванні ВРО.

У проведених дослідах ферментативне ВРО моделювали шляхом додавання надлишку нікотинамідаденіндинуклеотид фосфату відновленого (НАДФ·$H^{+)}$ в гомогенізати мозку білих щурів. АОА оцінювали по ступеню пригнічення кінцевого продукту ВРО - малонового діальдегіду (МДА). До 0.5 мл гомогенізату (цитозольного витягу тканини мозгу білих щурів), який був приготовлений на 0.15 М фосфатному буфері, рН 7.4 (із розрахунку 200 мл гомогенату на 12 мл буферу і центрифугування при 12000 об/хв протягом 15 хв [6]), додавали 0.2 мл 50.0 мМ розчину НАДФ·H^{+} (0.40 мкг/мл). Експериментальні комплекси вводили в систему в дозі 0.01 мл, після чого суміш інкубували протягом 30 хвилин при 37°С. Вміст МДА в гомогенізаті визначали по реакції з тіобарбітуровою кислотою методом спектрофотометрії [7,8]. АОА виражали в процентах пригнічення утворення МДА за формулою:

$$AOA = \frac{C_x - C_o}{C_x} \cdot 100\%$$

де : Сх - концентрація МДА в контрольних пробах;
Со - концентрація МДА в дослідних пробах.

Неферментативне ініціювання ВРО моделювали в суспензії яєчних ліпопротеїдів додаванням солей двохвалентного заліза, що адекватне кінцевому етапу ВРО [9]. АОА також оцінювали по ступеню пригнічення утворення кінцевого продукту ВРО - МДА. Досліджувані екстракти чебрецю вносили в

систему в дозі 0.05 мл перед ініціюванням процесів ВРО. Робочу суспензію яєчних ліпопротеїдів, яка була приготовлена із розрахунку: яєчні ліпопротеїди - 0.15 М KCl 1:1, розводили в 25 разів 4.0 мМ фосфатним буфером рН 7.4. До 1.0 мл суспензії додавали 1 мл 25 мМ десятиводного сульфата заліза закисного і доводили водою до 10 мл. Суміш інкубували 15 хвилин при 35^{o}С. До 2 мл суміші додавали 1.0 мл 10% розчину трихлороцтової кислоти і 15 хвилин центрифугували при 3000 об/хв. До 2.0 мл надосаду додавали 1.0 мл 0.8% розчину тіобарбітурової кислоти, кип'ятили 20 хвилин і визначали кількість МДА за вищеозначеною спектрофотометричною методикою. АОА виражали в процентах пригнічення утворення МДА. Оцінку антиоксидантної активності препаратів проводили у порівнянні з дією фармакологічних стандартів унітолом, при ферментативному ініціюванні ВРО, і дібунолом, при неферментативному ініціюванні ВРО.

Отримані дані оброблені загальноприйнятими методами статистики з розрахунком середнього арифметичного і його стандартної похибки. Достовірність похибки результатів дослідів меньше 0.05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Під час вивчення антиоксидантної активності екстрактів чебрецю в дослідах in vitro на двох моделях ініціювання ВРО було встановлено, що цей вид активності характерний для обох комплексів, але в різній мірі. Даний факт наглядно проілюстрований в таблицях 1 і 2.

Ферментативний спосіб ініціювання ВРО в гомогенаті тканин мозку моделює всі етапи вільнорадикальних процесів, які виникають під час розвитку різноманітних патологій. Наведена модель враховує взаємодію речовин як з ферментами захисту, так і з вільними радикалами.

Таблиця 1 - Антиоксидантна активність водо- і спирторозчинних комплексів, вилучених з чебрецю, при ферментативному ініціюванні ВРО

Препарат	Доза	МДА, мкмоль/мл	АОА, %
Контроль	---	0.860 ± 0.012	---
ВК	0.010 мл	0.678 ±0.038	21.1
СК	0.010 мл	0.702 ± 0.021	18.3
Унітол	0.078 мкм/мл	0.700 ± 0.027	18.6

Таблиця 2 - Антиоксидантна активність водо- і спирторозчинних комплексів, вилучених з чебрецю, при неферментативному ініціюванні ВРО

Препарат	Доза	МДА, мкмоль/мл	АОА, %
Контроль	---	4.92 ± 0.142	---
ВК	0.05 мл	3.12 ± 0.051	34.7
СК	0.05 мл	2.77 ± 0.043	43.7
Дібунол	3.00 мкм/мл	3.68 ± 0.087	25.2

Дані таблиці 1 свідчать, що на моделі НАДФ·H^{+} - залежного ВРО антиоксидантну активність проявляють обидва екстракти, але в різній мірі. Найбільш вираженою АОА володіє водний екстракт. Ефективність дії спиртового комплексу знаходиться практично на одному рівні з унітолом.

Таким чином, у даному випадку діють як прямий, так і непрямий антиоксидантні ефекти сполук, які входять до складу досліджуваних комплексів.

Неферментативна модель ініціювання ВРО відображає кінцевий, перекисний етап вільнорадикальних процесів. Тому, виявлений на даній моделі пріоритет спиртового екстракту, можна пояснити дією фенольних і поліфенольних сполук, які містяться в ньому. Відома їх роль в гальмуванні процесів ВРО як за рахунок інгібірування вільних радикалів жирних кислот, так і за рахунок зв'язування металів перемінної валентності (Fe, Cu, Zn, Co), які приймають участь в реакціях утворення гідроксилрадикала (реакції Фентона і Габера-Вейсса).

ВИСНОВКИ

1. Встановлена антиоксидантна активність in vitro експериментальних фракцій чебрецю: на моделі ферментативного ініціювання ВРО у водного комплекса фармакологічна дія перевищує еталон порівняння - унітол - на 2.7% і знаходиться на одному з ним рівні у спиртовому комплексі; на моделі неферментативного ініціювання ВРО в яєчних ліпопротеїдах і водо- і спирторозчинна фракції чебрецю перевищують дію ліпофільного фармакологічного еталону - дібунолу - відповідно на 9.5% і 18.5%.

2. Дослідження доводять перспективність отримання препаратів з антиоксидантною дією на основі водо- і спирторозчинного комплексів, вилучених з трави чебрецю.

ЛІТЕРАТУРА

Варфоломеев С.Д., Мевх А.Т. Простогландины - молекулярные биорегуляторы. - М.: изд-во МГУ, 1985. - 303 с.

Прокопенко С.А. Природные антиоксиданты. Сообщение 1. Растительные источники получения, свойства и химический состав антиоксидантов // Фармаком. - 1995. -№ 5/6. - С. 32-36.

Барабой В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений. - К.: Наук. думка, 1976. - 260с.

Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Hippuridaceae - Lobeliaceae. - СПб: Наука, 1991. - 200 с.

Батура Н.Р., Толок А.Я., Омельянчик Л.О. Оптимізація умов вилучення комплексів діючих речовин з трави чабрецю // Фармацевтичн. журн. - 1997. - № 1. - С. 103-106.

Беленичев И.Ф. Целенаправленный поиск антиоксидантов среди производных 1,2,4-триазола и хиназолина: Автореф. дис. канд. фарм. наук: 15.00.02/ Львовский гос. мед. инт. - Львов, 1991. - 21 с.

Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. и др. Определение антиоксидантной активности плазмы крови в яичных липопротеидах // Лаб. дело. - 1988. - № 5. - С. 59-62.

Перекисное окисление липидов в норме и патогенезе различных заболеваний: Сб. научн. трудов / Под ред. М.И. Агаджанова. - Ереван: Анастан, 1988. - 220 с.

Беленичев И.Ф., Мазур И.А., Коваленко С.И. Комплексная оценка антиоксидантной активности in vitro производных (3,4-дигидрохиназолон-4-ил-3)-α, β-карбоновых кислот // Фармаком. - 1995. - № 5/6. - С. 40-43.