

УДК 615.272.4.074

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ ГІПОАЗОТЕМІЧНОЇ ДІЇ ГІФЛАРИНУ НА H_2O_2 -ІНДУКОВАНУ ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНЦІЮ СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ В СИСТЕМІ IN VITRO

Гордієнко А.Д. д.фарм.н.

Харківська державна зооветеринарна академія, м.Харків

Анотація. Досліджено вплив препарату гіпоазотемічної дії гіфларину (1% р-н в ампулах), діючою субстанцією якого є флавоноглікозидгіперозид, отриманої зі звіробою, на H_2O_2 -індуковану люмінолзалежну ХЛ сироватки крові щурів в порівнянні з антиоксидантами силібором і кверцетином. Гіфларин інгібував ХЛ сироватки крові, АОА якого була в 2,88 разів вища силібору і в 2,53 разів - кверцетину.

Ключові слова: рослинні поліфеноли, гіфларин, антиоксидантна активність, вільнорадикальне окиснення, хемілюмінесценція.

Актуальність проблеми. Для корекції порушень прооксидантно-антиоксидантної системи, що має місце в патогенезі хронічної ниркової недостатності, використовують поліфенольні препарати, які забезпечують його антиоксидантні властивості [6].

Раніше, за допомогою розробленого полярографічного експрес-методу визначення антиоксидантної активності (АОА) фенольних сполук було показано, що створений у Державному науковому центрі лікарських засобів, м.Харків і впроваджений в медичну практику оригінальний лікарський препарат гіпоазотемічної дії гіфларин (1% р-н в ампулах), діючою субстанцією якого є флавоноглікозидгіперозид, інгібує залізоіндуковане НАДФН- і аскорбатзалежне ПОЛ інтактних мікросом щурів [3].

В теперішній час для оцінки інтенсивності вільнорадикальних реакцій застосовуються прямі методи виявлення вільних радикалів (ВР), до яких відноситься і хемілюмінесценція (ХЛ). Висока ефективність ХЛ пов'язана з тим, що час життя радикалів надзвичайно малий, а використання прямих методів реєстрації дозволяє оцінювати інтенсивність реакцій по мірі їх протікання [4].

Застосування хемілюмінесцентного метода особливий інтерес викликає при вивченні вільнорадикального окиснення (ВРО) ліпідів у крові, в сироватці і впливу антиоксидантів на вказані процеси [4,5]. Це пов'язано з тим, що дані, одержані при аналізі крові, свідчать про загальні зміни, які проходять в організмі, внаслідок чого їх можна використовувати в експрес-діагностиці ВРО ліпідів і скринінзі нових антиоксидантів, які інгібують ВРО.

Завдання дослідження. Вивчити вплив гіфларину (1% р-н в ампулах) на H_2O_2 - індуковану люмінолзалежну ХЛ сироватки крові щурів в порівнянні з поліфенольними субстанціями силібором і кверцетином в системі in vitro.

Матеріал і методи дослідження. Дослідження проводили з сироваткою крові безпородних білих щурів-самців масою 200-220 г., яких утримували на стандартному раціоні віварію. Сироватку крові одержували завдяки загальноновизнаній методиці. H_2O_2 - ініційоване ВРО ліпідів сироватки реєстрували хемілюмінесцентним методом при $+37^\circ\text{C}$ в скляній кюветі в умовах постійного перемішування [2]. ХЛ вимірювали на хемілюмінометрі ХЛ-01, оснащеному ФЭУ-51. Прилад прокалібрований в абсолютних одиницях квант/с-4 п відповідно до програми і методики метрологічної атестації хемілюмінометра, проведеного і затвердженого Національним науковим центром (Інститут метрології, м.Харків), протокол №19 від 09.01.2002. До 1мл буфера, вміщуючого 60 ммоль KH_2PO_4 і 105 ммоль KCl (рН 7,4), добавляли 0,1 мл 10^{-3} ммоль люмінола і 0,05мл сироватки крові. Реакцію ініціювали добавленням 0,1мл 3% H_2O_2 . Гіфларин і поліфенольні субстанції силібор і кверцетин розчинені в буфері вводили в кювету перед добавленням H_2O_2 . Рівень ХЛ оцінювали по максимуму спалаху. Антиоксидантний ефект гіфларину і поліфенольних субстанцій оцінювали по ID_{50} , концентрації речовин в мкг/мл, які інгібують ХЛ сироватки на 50,0% на максимумі спалаху. Чим менше значення ID_{50} , тим більш активна речовина. Достовірність одержаних результатів оцінювали за допомогою критерію Ст'юдента [1].

Результати дослідження. При додаванні до сироватки крові щурів H_2O_2 розвивався спалах ХЛ (рис.), де можна виділити швидке підняття, максимум спалаху і швидкий спад спалаху. Оскільки ХЛ спостерігається в результаті виникнення та рекомбінації ВР, можна припустити, що спалах ХЛ, який виник в сироватці крові в відповідь на введення H_2O_2 також є слідством вільнорадикальних

процесів в ліпідах. Спалах ХЛ, який виник після введення в сироватку H_2O_2 , обумовлений розкладом H_2O_2 іонами заліза сироватки крові, відповідно реакції Фентона [5].

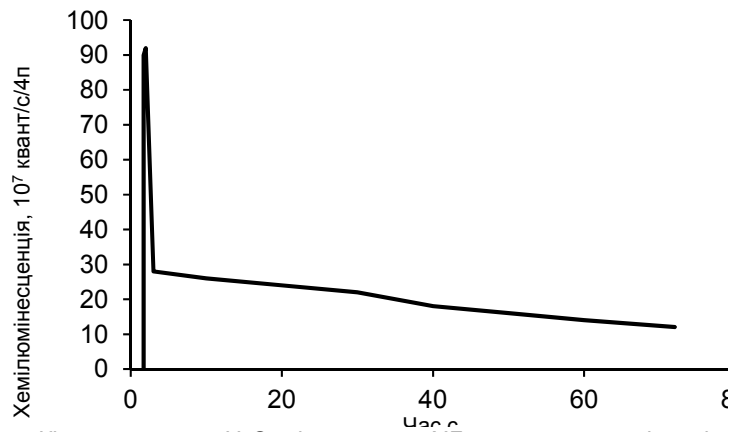


Рис. Кінетична крива H_2O_2 - індукованої ХЛ сироватки крові щурів

Як видно з таблиці, вивчаємі рослинні поліфеноли по різному пригнічували максимальний спалах ХЛ сироватки щурів.

Таблиця

Вплив рослинних поліфенолів на H_2O_2 -індуковану люмінолзалежну хемілюмінесценцію сироватки крові щурів в системі in vitro, n=6

Препарат і субстанції	ID ₅₀ , мкг/мл
Гіфларин	13,1±1,3* p<0,001
Силібор	37,8±3,6 p>0,5
Кверцетин	33,2±2,9

Примітки: * - відмінності, вірогідні в порівнянні з субстанцією кверцетин, n – кількість вимірювань

Розраховані на основі даних, наведених в таблиці величини ID₅₀ рівні концентраціям поліфенолів, які інгібують спалах ХЛ на 50% свідчать про те, найбільший антиоксидантний ефект чинив гіфларин, найменший - силібор. Гіфларин інгібував реакцію на 50% в концентраціях в 2,88 разів меншій в порівнянні з силібором і в 2,53 рази – з кверцетином 13,1±1,3; 37,8±3,6; і 33,2±2,9; відповідно. Силібор і кверцетин по активності між собою були практично однаковими. Більш високу АОА гіфларину в порівнянні з силібором і кверцетином можна пояснити особливістю структури молекул гіфларину в порівнянні з іншими поліфенолами, за рахунок чого і проявляється антиоксидантна дія [2,3].

Люмінол активує ХЛ сироватки, взаємодіючи з активними формами кисню (АФК), які утворюються в результаті ВРО ліпідів сироватки. Вивчаємі рослинні поліфеноли зв'язують (інактивують) АФК і ВР, які виникають при ВРО ліпідів сироватки і таким чином пригнічують ланцюгові реакції, що і проявляється в зниженні спалаху ХЛ сироватки [4].

Виявлені дані про антиоксидантну дію поліфенолів на вивчаємі моделі ВРО ліпідів сироватки свідчать на їх здатність виступати в ролі "ловушок" гідроксильних радикалів.

Представлені дані про антиоксидантну дію гіфларину на моделі H_2O_2 -ініційованої ХЛ сироватки мають пряму кореляцію з антиоксидантною активністю вказаних поліфенолів, проведених раніше на моделі ферментативного і аскорбатзалежного ПОЛ інтактних мікросом з печінки щурів [3]. Одержані результати можуть представляти інтерес для скринінга на АОА нових БАР, які інгібують ВРО ліпідів в сироватці крові та вивчення механізмів їх антиоксидантної дії.

Висновок

Встановлено, що гіфларин інгібує H_2O_2 -індуковану ХЛ сироватки крові щурів. В досліджену діапазоні концентрацій виявлена пряма кореляція між антиоксидантною дією і концентрацією препарату в інкубаційному середовищі. Значно висока АОА гіфларину (в 2,53 і 2,88 рази) в порівнянні з кверцетином і силібором, відповідно, обумовлена особливостями структури молекул гіфларину, за рахунок чого і проявляється АОА.

Література

1. Ашмарин И.П. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов / И.П. Ашмарин, Н.Н. Васильев, В.А. Амбросов. – Л.:Изд. Ленинградского университета, 1975. – 77с.
2. Гордієнко А.Д. Інгібування H_2O_2 - індукованої люмінолзалежної хемілюмінесценції сироватки крові щурів новими рослинними поліфенолами / А.Д. Гордієнко, Л.В. Яковлева // Медична хімія. – 2008. – Т.10, №1. – С.80–83.
3. Гордієнко А.Д. Дослідження антиоксидантної активності препарату гіпоазотемічної дії "Гіфларин" на моделі ПОЛ мікросом з печінки щурів в системі in vitro / А.Д. Гордієнко, Л.В. Яковлева // Фармац. журн. – 2008. – №4. – С.63–65.
4. Косолапов В.А. Изучение антирадикальной активности новых соединений методами хемилюминесценции / В.А. Косолапов, А.А. Спасов, В.А. Анисимова // Биомедицинская химия. – 2005. – Т.51, Вып.3. – С.287–294.
5. Кузьменко А.И. Характеристика H_2O_2 -инициированного окисления липидов сыворотки крови по кинетическим параметрам хемилюминесценции / А.И. Кузьменко // Укр. биохим. журнал. – 1999. – Т.71, №4. – С.63–66.
6. Степанова Н.М. Стан прооксидантної і антиоксидантної систем у хворих з хронічною нирковою недостатністю та шляхи його корекції / Н.М. Степанова // Ліки України. – 2003. – №3. – С.10–12.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ГИПОАЗОТЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГИФЛАРИНА НА H_2O_2 -ИНИЦИИРОВАННУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС В СИСТЕМЕ IN VITRO

Гордиенко А.Д. д.фарм.н.

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Аннотация. Изучено влияние препарата гипоазотемического действия гифларина (1% р-р в ампулах), действующей субстанцией которого является флавоногликозидгиперозид, полученной из зверобоя, на H_2O_2 -инициированную люминолзависимую ХЛ сыворотки крови крыс в сравнении с антиоксидантами силибором и кверцетином. Гифларин ингибировал ХЛ сыворотки крови, АОА которого была в 2,88 раза выше силибора и в 2,53 раза - кверцетина.

Ключевые слова. растительные полифенолы, гифларин, антиоксидантная активность, свободнорадикальное окисление, хемилюминесценция.

INFLUENCE OF PREPARATION OF HYPOAZOTAEMIC ACTION OF GIFLARIN ON H_2O_2 – THE INDUCED CHEMILUMINESCENCY OF BLOOD SERUM OF RATS IN VITRO

Gordienko A.D.

Kharkiv State Zooveterinary Academy, Kharkiv

Summary. The investigation of the influence of the preparation of hypoazotaemic action – Giflarin(1% solution in ampulla), the active substance of which is flavonoglicosidhyperoside, produced from St. John's wort on H_2O_2 – the induced luminole dependent chemiluminescency of blood serum of rats in comparison with antioxidants Sylibor and Quertsetin has been carried out. Giflarin inhibited chemiluminescency of blood serum, AOA of which was 2,88 times as high as Sylibor and 2,53 times higher than Quertsetin.

Key words: plant polyphenol, Giflarin, antioxidant activity, free radical oxidation, chemiluminescency.