

К. М. Середюк, Н. Є. Стадницька, О. С. Яремкевич, І. В. Павлюк, І. В. Дякон
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармацевції та біотехнології

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИН

© Середюк К. М., Стадницька Н. Є., Яремкевич О. С., Павлюк І. В., Дякон І. В., 2016

Досліджено інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисної модифікації білків (ОМБ) екстрактів зі шроту лікарських рослин материнки звичайної (*Origanum vulgare L.*), моркви дикої (*Daucus carota*), хмелю звичайного (*Humulus lupulus*). Порівняно їхні активності з відомим антиоксидантом – аскорбіною кислотою. Встановлено, що за дії всіх досліджуваних екстрактів лікарських речовин спостерігається гальмування вільнорадикальних процесів за двома показниками оксидативного стресу – ПОЛ та ОМБ, що відображає зниження рівня їх тіобарбітур-активних продуктів (ТБКАП) та вмісту карбонільних груп (КГ) відносно контролю.

Ключові слова: шрот, екстракти лікарських рослин, антиоксидантна активність, ліпопероксидація, вільнорадикальне окиснення.

Seredyuk K. M., Stadnytska N. E., Yaremkevych O. S., Pavlyuk I. V., Dyakon I. V.

RESEARCH OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MEDICINAL PLANTS EXTRACTS

© Seredyuk K. M., Stadnytska N. E., Yaremkevych O. S., Pavlyuk I. V., Dyakon I. V., 2016

The intensity of lipid peroxidation (LPO) and oxidative modification of proteins (OMP) by extracts from herbs meal Oregano (*Origanum vulgare L.*), wild carrot (*Daucus carota*), conventional hops (*Humulus lupulus*) was researched. The comparison of their activities with known antioxidant ascorbic acid was carried out. It was established that under the influence of investigated extracts was observed inhibition of free radical processes in two indices of oxidative stress – LPO and OMP, reflecting the decline in their tiobarbitur-active products (TBKAP) and the content of carbonyl groups (CG) relative to control.

Key words: meal, extracts of medicinal plants, antioxidant activity, lipid peroxidation, free radical oxidation.

Постановка проблеми. Вважають, що однією з основних причин виникнення таких важких захворювань, як злоякісне новоутворення, хронічний перебіг запальних процесів, СНІД, цукровий діабет, неврологічні патології, атеросклероз, ішемічна хвороба серця, наслідки інфаркту, інсульту, хвороб Альцгеймера та Паркінсона є накопичення вільних радикалів в організмі людини [1, 2]. Зростання концентрації вільних радикалів посилюється як внаслідок радіації, УФ-опромінення, паління, алкоголізму, постійних стресів, інфекційних захворювань, неякісного харчування, так і внаслідок зниження активності природної антиоксидантної системи людини.

Сьогодні посилюється інтерес до визначення антиоксидантної активності рослинної сировини, біологічно активних речовин, харчових продуктів та напоїв. Найкращими джерелами антиоксидантів є рослини, зокрема лікарські, які містять їх у вигляді комплексів споріднених сполук. До складу таких комплексів входять фенольні сполуки (флавоноїди, флавоноли, катехіни

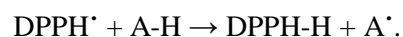
тощо), вітаміни (С, Е), каротини, мінеральні речовини [3], які здатні попереджувати вільнорадикальне окиснення біологічних структур організму, уповільнюючи процеси старіння та розвитку патологічних змін.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Як відомо, важливою ланкою патогенезу багатьох захворювань є оксидативний стрес [4], в результаті якого відбувається активація пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та окисна модифікація білка (ОМБ) і як результат – накопичення вільних радикалів, що спричиняє значні зміни в обмінних процесах клітини та структурно-функціональної цілісності (мікрров'язкості) клітинних мембран та білкових структур. Все це супроводжується дисбалансом ферментативних і неферментативних компонентів системи антиоксидантного захисту [5]. Такий дисбаланс є основою розвитку оксидантного стресу, який супроводжується накопиченням в тканинах і біологічних рідинах активних форм кисню і вторинних продуктів окиснювальної модифікації біомолекул, що належать до різних класів органічних сполук (білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти). За нормальних фізіологічних умов рівень ПОЛ невисокий та підтримується завдяки рівновазі про- та антиоксидантів, а вони, своєю чергою, є важливими складовими гомеостазу організму [6]. Для нейтралізації впливу вільних радикалів використовують сполуки, які належать до різних груп біологічно активних речовин (БАР), які об'єднують під загальною назвою антиоксиданти. Експериментальна і клінічна медицина має значний досвід розробки і використання БАР з антиоксидантною дією за різних патологій.

Доведено, що антиоксиданти впливають на процеси вільнорадикального окиснення ліпідів біологічних мембран, уповільнюють і припиняють їх. Згідно з літературними даними [7], найвищу антиоксидантну дію має рослинна сировина з високим вмістом фенольних та поліфенольних сполук, вітамінів А, Е, К і С. Відомо вже давно [8], що просторово екрановані феноли посідають перше місце серед промислових антиоксидантів і за своєю будовою та властивостями подібні до вітаміну Е.

Особливо перспективними об'єктами з високим вмістом фенольних сполук є шроти лікарських рослин, які є кінцевим продуктом фармацевтичних виробництв [9]. В Україні щорічно після виробництва фітопрепаратів, зокрема екстрактів та настоянок з лікарської рослинної сировини, шрот, який отримують в результаті первинної переробки, стає відходами, незважаючи на те, що містить значну кількість БАР. Повторною екстракцією рослинного шроту з використанням інших розчинників можна одержати цінну субстанцію із сумарним вмістом поліфенольних сполук у шишках хмелю 505,4–559,6 мг/г, в траві материнки 542,8–548,2 мг/г, плодах моркви дикої від 171,9–174,1 мг/г залежно від серії. Відповідно сума флавоноїдів для шишок хмелю 3,65–3,77 мг/г, для трави материнки 6,51–6,75 мг/г, для плодів моркви дикої 2,51–2,57 мг/г [9]. Ці екстракти можна використати для потреб косметичної або харчової промисловості, для розроблення препаратів з новими фармакологічними властивостями, що дасть змогу розширити номенклатуру вітчизняних препаратів, підвищити рентабельність виробництв, раціонально використовувати природні ресурси та зменшити їх негативний вплив на навколишнє середовище.

Для виявлення антиоксидантних властивостей екстрактів із шротів лікарської рослинної сировини використовують метод, оснований на їх взаємодії з 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилом (DPPH):

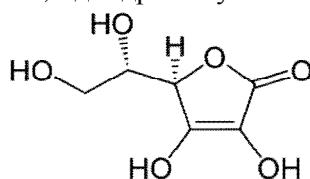


За результатами попередніх досліджень було встановлено, що 70 %-ві екстракти із шротів трави материнки звичайної, плодів моркви та шишок хмелю виявляють високий рівень антиоксидантної активності (АОА), це відповідно 92 %, 86,88 % та 31,802 % [10, 11].

Мета роботи. Метою роботи було дослідження впливу екстрактів зі шротів лікарських рослин на процеси пероксидного окиснення ліпідів та окисної модифікації білків у тканинах курячої печінки, що зможе наблизити до розуміння механізмів біологічної дії цих екстрактів, застосування їх лікувальних властивостей у фармакології та медицині.

Виклад основного матеріалу і обговорення результатів. Процеси біологічного окиснення займають одне з центральних місць в метаболізмі клітини та організму загалом. Якщо при дії зовнішніх впливів чи в результаті захворювань рівновага між потужністю прооксидантної і антиоксидантної систем зміщується в бік першої, то виникає оксидативний стрес. Для оцінювання напрямку таких змін використовують показники оксидативного стресу: вміст пероксидів ліпідів та продуктів їх метаболізму (ТБК-активні продукти), а також вміст карбонільних груп білків як результат ОМБ.

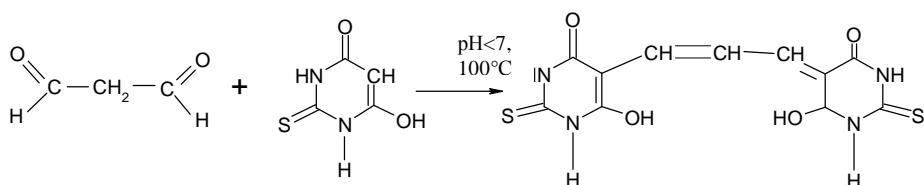
Дослідження проводили на гомогенаті курячої печінки. Для досліджень ПОЛ та ОМБ використовували екстракти, одержані триступеневою мацерацією промислових шротів трави материнки, шишок хмелю та плодів моркви дикої 70 % водно-етанольною сумішшю при кімнатній температурі $20 \pm 2-3$ °C у концентрації 10^{-4} мг/мл. Для порівняння антиоксидантних властивостей екстрактів, окрім контролю, було додатково проведено дослідження з відомим антиоксидантом аскорбіновою кислотою (гамма-лактон 2,3-дегідро-L-гулонової кислоти).



Аскорбінова кислота

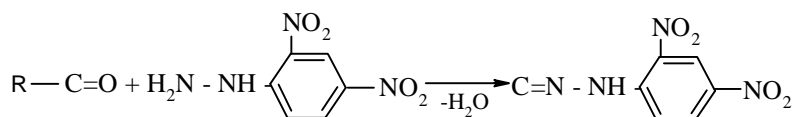
Визначали обидва показники оксидативного стресу в одній пробі [12]. У відібраних зразках реакцією малонового діальдегіду (МДА) з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) визначали вміст вторинних продуктів ліпопероксидації (ТБК-активних продуктів). Принцип методу ґрунтується на активації ПОЛ іонами двовалентного заліза до рівня, який реєструється спектрофотометрично. При високій температурі в кислому середовищі МДА реагує з ТБК, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при 532 нм (Схема 1) [13]. Кількість білка у пробах визначали за методом Лоурі [14]. Ступінь ОМБ визначали за кількістю утворених додаткових карбонільних груп (КГ) у бічних ланцюгах амінокислот, вміст яких визначали в реакції з 2,4-динітрофенілгідразином (Схема 2) [12]. Вміст КГ білків визначали на спектрофотометрі "Specord M-40" при довжині хвилі 370нм.

Схема 1



Триметиновий комплекс яскраво червоного кольору

Схема 2



2, 4 – динітрофенілгідразин 2,4 – динітрофенілгідразон

У результаті проведених досліджень ліпопероксидації (рис. 1) було встановлено, що за дії всіх досліджуваних екстрактів шротів лікарських рослин відбувається значне зниження вмісту ТБК-активних продуктів порівняно з контролем та аскорбіновою кислотою, яку було обрано як еталон порівняння.

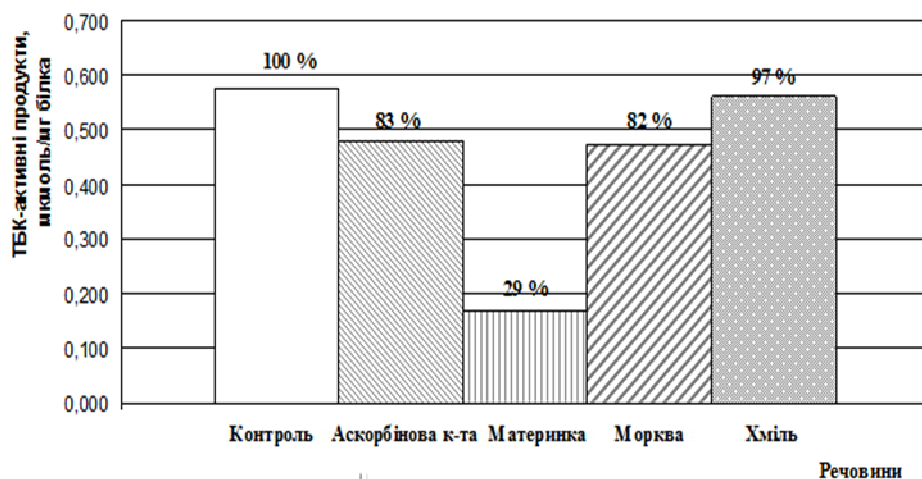


Рис. 1. Вміст ТБКАП у гомогенаті курячої печінки за дії 40 % етанолових екстрактів лікарських рослин у концентрації 10^{-4} мг/мл порівняно з контролем та аскорбіновою кислотою

Як видно з діаграми, аскорбінова кислота у концентрації 10^{-4} мг/мл підтверджує свої антиоксидантні властивості, оскільки спостерігається зниження ТБАКП на 17 % порівняно з контролем. При застосуванні екстракту материнки звичайної (*Origanum vulgare L.*) спостерігається зниження вмісту ТБАКП на 71 % порівняно з контролем. Це свідчить, що екстракт цієї лікарської рослини проявляє високі показники антиоксидантної активності у процесах ПОЛ навіть порівняно з еталоном. Екстракт моркви дикої (*Daucus carota*) знижував вміст ТБАКП на 18 %, тобто в межах дії аскорбінової кислоти. Результати досліджень екстракту хмелю звичайного (*Humulus lupulus*) показали незначне зниження вмісту ТБАКП – лише на 3 % порівняно з контролем. Це підтверджує, що цей екстракт не володіє антиоксидантною активністю, але разом з цим не проявляє прооксидантних властивостей.

На діаграмі (рис. 2) видно, що всі досліджувані екстракти шротів лікарських рослин значно знижують вміст КГ як порівняно з контролем, так і порівняно з аскорбіновою кислотою. Це свідчить про високі показники антиоксидантної активності за результатами досліджень ОМБ.

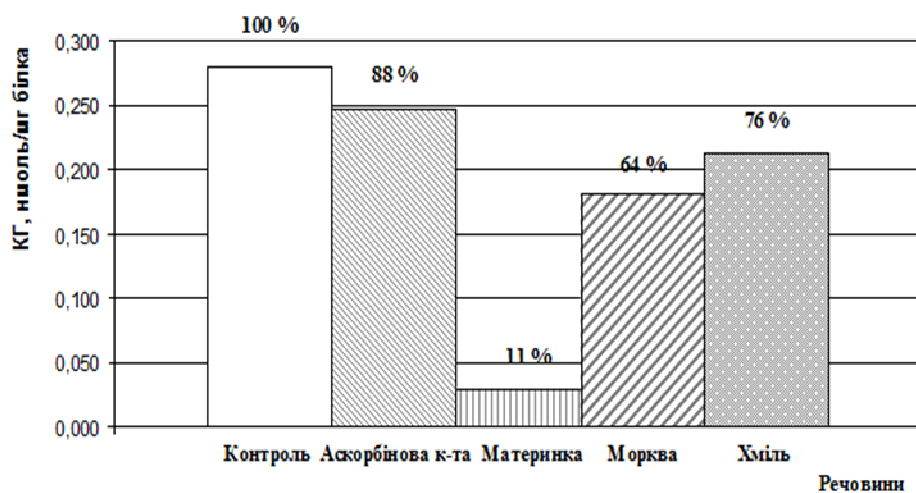


Рис. 2. Вміст КГ у гомогенаті курячої печінки за дії 70 % етанолових екстрактів шротів лікарських рослин у концентрації 10^{-4} мг/мл порівняно з контролем та аскорбіновою кислотою

Найефективнішим серед досліджуваних екстрактів виявився екстракт материнки звичайної (*Origanum vulgare L.*), оскільки при його використанні спостерігається зниження вмісту КГ на 89 % порівняно з контролем та на 77 % порівняно з еталоном. Менш виражену антиоксидантну

активність в процесах ОМБ проявили екстракти моркви дикої (*Daucus carota*) та хмелю звичайного (*Humulus lupulus*), при застосуванні яких знижується вміст КГ порівняно з контролем на 46 % та 34 % та порівняно з еталоном на 24 % і 12 % відповідно.

Висновки. Аналіз отриманих результатів показав, що при використанні всіх досліджуваних екстрактів із промислових шротів трави материнки звичайної, шишок хмелю звичайного та насіння моркви дикої спостерігається достовірне зменшення вмісту ТБК-активних продуктів та утворення КГ порівняно з контролем та відомим антиоксидантом – аскорбіновою кислотою, що свідчить про зниження інтенсивності процесів ПОЛ та ОМБ і антиоксидантну активність цих витяжок. З ряду досліджуваних екстрактів найкращу антиоксидантну дію за двома показниками оксидативного стресу порівняно з контролем і аскорбіновою кислотою проявив екстракт материнки звичайної (*Origanum vulgare* L.), що робить доцільним його застосування в умовах вільно-радикального стресу.

1. Балоболкин М. И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета / М. И. Балоболкин, Е. М. Клебанова // Проблемы эндокринологии. – 2000. – Т. 46, № 6. – С. 29–34.
2. Голиков А. П. Свободнорадикальное окисление и сердечно-сосудистая патология: коррекция антиоксидантами / А. П. Голиков, С. А. Бойцов, В. П. Михин, В. Ю. Подумисков // Лечащий врач. – 2003. – № 4. – С. 70–74.
3. Prochazkova D. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids / D. Prochazkova, I. Bousova, N. Wilhelmova // Fitoterapia. – 2011. – Vol. 82. – P. 513–523.
4. Гончарук Є. Г. Вільнорадикальне окиснення як універсальний неспецифічний механізм пошкоджуючої дії шкідливих чинників довкілля (огляд літератури та власних досліджень) / Є. Г. Гончарук, М. М. Коршун // Ж-л Акад. мед. наук України. – 2004. – Т. 10, № 1. – С. 131–150.
5. Michiels, C. Cytotoxicity of linoleic acid peroxide, malondialdehyde and 4-hydroxynonenal towards human fibroblast / C. Michiels, J. Remacle // Toxicology. – 2004. – Vol. 66, № 2. – P. 225–234.
6. Гуріна О. Перебіг вільнорадикальних процесів і підбір антиоксидантної терапії при ішемічній хворобі серця / О. Гуріна, А. Глуценко // Ліки України. – 2003. – № 4. – С. 13–19.
7. Головка М. П. Антиоксидантні властивості деяких видів рослинної сировини / М. П. Головка, Н. М. Пенкіна, В. В. Колесник // Восточно-Европейский журнал передовых технологий: сб. науч. тр. – 2011. – Т. 4/6(52). – С. 9–11.
8. Єршов В. В. Пространственно-затрудненные фенолы / В. В. Єршов, Г. А. Нукифоров, А. А. Володькин // Химия, М. – 1972. – 257с.
9. Павлюк І. В. Оптимізація умов технологічного процесу переробки шроту *Origanum vulgare*, *Daucus carota*, *Humulus lupulus* / І. В. Павлюк, Н. Є. Стадницька // Вісник Нац. ун-ту “Львівська політехніка”. Хімія технологія речовин та їх застосування. – № 787. – Львів. – 2015. – С. 244–248.
10. Павлюк І. В. Дослідження біологічної активності вторинного екстракту зі шроту трави материнки звичайної (*Origanum vulgare*) / І. В. Павлюк, Н. Є. Стадницька, І. Ясічка-Місяк, П. П. Вечорек, Г. В. Загорій, О. М. Брезвин, Г. В. Рудик, В. П. Новіков // Український біофармацевтичний журнал. – 2015. – № 1(36). – С. 21–24.
11. Pavlyuk, I. A study of the Chemical Composition and Biological Activity of Extracts from Wild Carrot (*Daucus carota* L.) Seeds Waste / Inessa Pavlyuk, Nataliya Stadnytska, Izabela Jasicka-Misiak, Boguslawa Gorka, Piotr P. Wiczorek, Volodymyr Novikov // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – № 6(2). – P. 603–611.
12. Луцак В. І. Показники оксидативного стресу. Тіобарбітурат-активні продукти і карбонільні групи білків / В. І. Луцак, Т. В. Багнюкова, О. В. Луцак // Укр. біохім. журн. – 2004. – № 3. – С. 136–141.
13. Тимирбулатов Р. Р. Методы повышения интенсивности свободно-радикального окисления липидосодержащих компонентов крови и его диагностическое значение / Р. Р. Тимирбулатов, Е. И. Селезнев // Лаб. деко. – 1981. – № 4. – С. 209–211.
14. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. G. Rosebrough, A. L. Farr, R. C. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, № 1. – P. 265–275.