



УДК 796.072.2

© 2007

Н. І. Джуренко, О. П. Паламарчук, Л. М. Гуніна, Л. П. Бабенко,
С. А. Олійник

Скринінг рослин з антиоксидантною та генопротекторною активністю

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Т. М. Червченко)

The results of screening model researches of the mechanisms of action of plant extracts, which were not in common use as medicinal till now, on the oxidization of lipids in fractions of animal liver chromatine are presented. The antioxidant and genom protective properties of plants (Cerasus tomentosa, Schizandra chinensis, Eleutherococcus senticosus, Chaenomeles japonica, Actinidia kolomikta, Ziziphus jujuba, Morus alba, Cydonia obJonga, Viburnum opulus, Cornus mas, Elaeagnus multiflora, Pastinaca sativa) specify the successful subsequent investigations with the purpose to use the preparations of these plants in different branches of medicine, including sport medicine, where they can be ergogenic remedies.

Істотний вплив техногенних — токсичних, канцерогенних та інших шкідливих агентів, які утворюються внаслідок нераціональної діяльності людства, особливо в поєднанні з інтенсивним ультрафіолетовим та іонізуючим опроміненням, тобто в умовах ендо- й екзоєкологічного неблагополуччя, є причиною того, що проблема пошуку потенційних засобів захисту живого організму стає дедалі актуальнішою [1]. Серед речовин, які здатні захистити організм, значне місце посідають антиоксиданти (АО), оскільки вони є однією з первинних ланок запуску детоксикаційних процесів, нормалізації імунodefіциту, порушеного обміну речовин, передусім пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) [1, 2].

Оскільки використання синтетичних АО має низку побічних ефектів та протипоказань, усе частіше увага дослідників спрямовується на застосування природних, зокрема, рослинних субстанцій, які виявляють значну захисну та біосорбційну активність щодо різноманітних шкідливих чинників [3].

Більшість плодово-ягідних рослин, у тому числі ті, що застосовуються в медичній практиці рідко або взагалі не застосовуються, є потенційними джерелами комплексу біологічно активних речовин (БАР), які гальмують накопичення вільних радикалів та токсичних продуктів метаболізму в організмі, сприяють підвищенню його адаптаційного потенціалу та неспецифічної резистентності, тобто мають широкий спектр фармакологічного впливу.

Саме таку антиоксидантну (захисну) дію справляють Р-вітамінні сполуки флавоноїдної природи, каротиноїди, токофероли, пектини, вітаміни різних класів тощо. Клітини рослин мають високий енергетичний потенціал, легко рухаються і завдяки БАР, які визначають спрямованість їх дії, в організмі людини легко вбудовуються в клітинні органели, зокрема мембрани, та проникають крізь плазмолему, стимулюючи роботу всіх органів і систем [4, 5]. Цей факт може бути підставою для застосування фітопрепаратів за дії різних фізіологічних та патологічних факторів не тільки з метою нормалізації гомеостазу та захисту геному, але й як ергогенних чинників при інтенсивних фізичних навантаженнях [6].

Зважаючи на вищесказане, метою досліджень був пошук рослин з антиоксидантними і геномозахисними властивостями та аналіз залежності антиоксидантної активності від вмісту деяких БАР у фітосировині.

Аналіз відповідних літературних джерел та проведені попередні скринінгові дослідження дозволили виділити такі перспективні лікарські види рослин, як: обліпіха крушиновидна (*Hippophae rhamnoides* L.), вишня повстиста (*Cerasus tomentosa* (Thunb.) Wall.), елеутерокок колючий (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.), лимонник китайський (*Schizandra chinensis* (Turcz.) Baill.), калина звичайна (*Viburnum opulus* L.), бузина чорна (*Sambucus nigra* L.), шовковиця біла (*Morus alba* L.), маслинка багатоквіткова (*Elaeagnus multiflora* Thunb.), дерен справжній (*Cornus mas* L.), актинідія коломікта (*Actinidia kolomikta* (Maxim.)), зизифус справжній (*Ziziphus jujuba* Mill.), хеномелес японський (*Chaenomeles japonica* Lindl.), айва довгаста (*Cydonia oblonga* Mill.), шефердія срібляста (*Schepherdia argentea* (Pursh) Nutt.), жимолость їстівна (*Lonicera edulis* Turcz. ex Freyn.), пастернак посівний (*Pastinaca sativa* L.).

Для проведення досліджень з рослинного матеріалу (листки, плоди), який відбирали на колекційних ділянках Національного ботанічного саду ім. М. М. Гришка НАН України, отримано спиртові екстракти (табл. 1).

Вміст біологічних речовин у рослинній сировині визначали за загальноприйнятими методами [7]. Дослідження антиоксидантної та геномопротекторної дії спиртових екстрактів рослин проводили на двох фракціях хроматину печінки щурів — репресованому (РХ) та транскрипційно-активному (ТАХ). Використовували 3-місячних щурів-самців лінії Вістар з масою тіла 150–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію.

З метою вивчення впливу спиртових екстрактів на вираженість антиоксидантного захисту та геномостабілізуючого ефекту у щурів досліджували активність ПОЛ у фракціях хроматину клітин печінки за умов дії тетрахлорметану (ТХМ) та при додаванні *in vitro* в суспензію зазначених спиртових екстрактів у кінцевому розведенні 1 : 100 та 1 : 1000. ТХМ

Таблиця 1. Досліджені рослинні екстракти

Номер екстракту	Рослинна сировина	Номер екстракту	Рослинна сировина
1	Обліпіха крушиновидна, листки	8п	Жимолость їстівна, плоди
2	Вишня повстиста, листки	9	Дерен справжній, листки
3	Елеутерокок колючий, листки	10	Актинідія коломікта, листки
4	Лимонник китайський, листки	11	Зизифус справжній, листки
5	Калина звичайна, листки	12	Хеномелес японський, листки
5п	Маслинка багатоквіткова, плоди	12с	Пастернак посівний, насіння
6	Бузина чорна, листки	13	Айва довгаста, листки
7	Шовковиця біла, листки	14	Шефердія срібляста, листки
8	Маслинка багатоквіткова, листки		

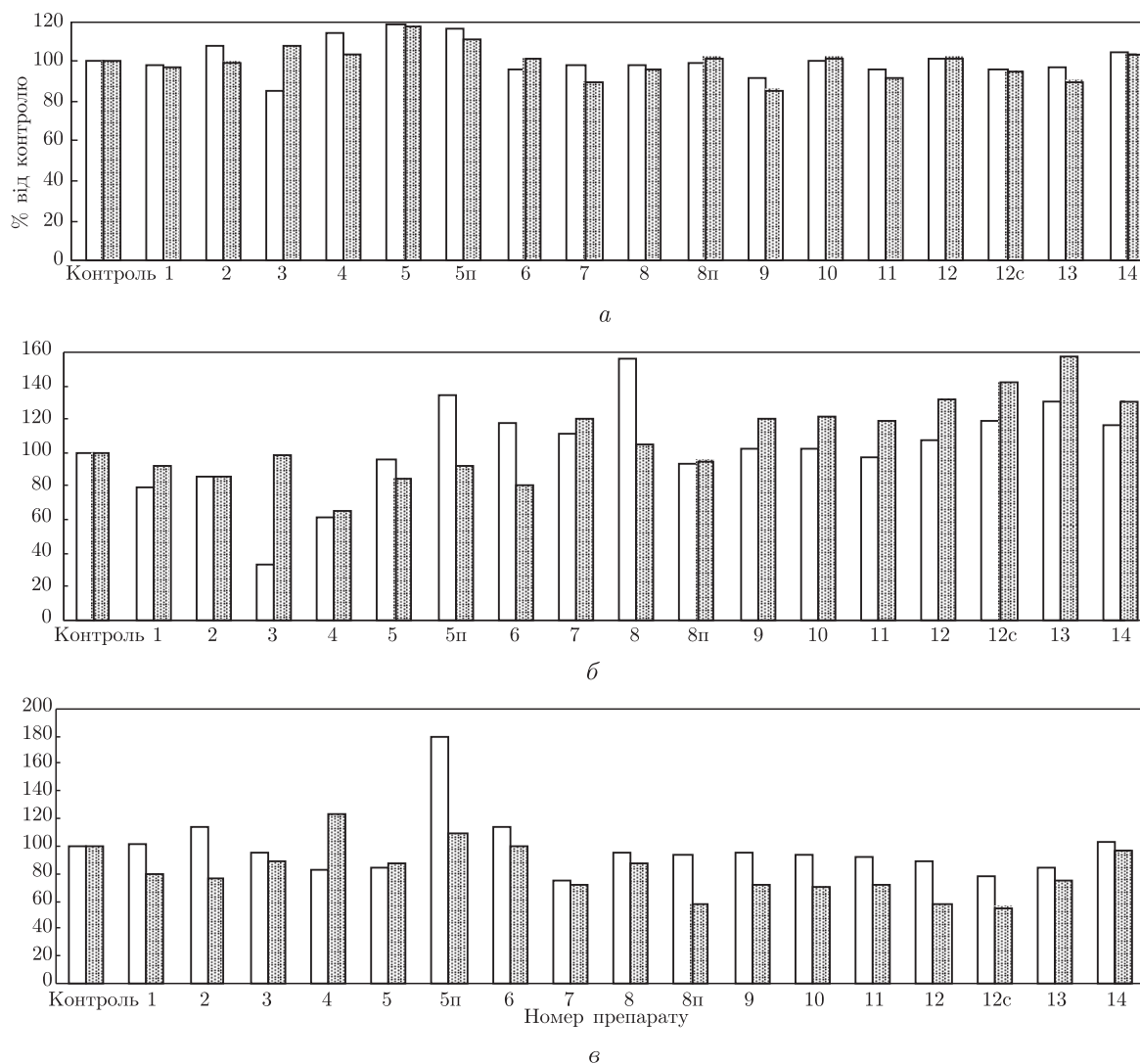


Рис. 1. Вплив досліджених екстрактів у розведеннях 1 : 100 (□) та 1 : 1000 (■) на активність ПОЛ (за змінами швидкості накопичення МДА) у фракції репресованого хроматину печінки щурів за дії тетрахлоретану: а – НЗП; б – АЗП; в – НП

експериментальним тваринам вводили внутрішньоочеревинно в дозі $1LD_{50}$ (1,75 мл/кг маси тіла) [8]. Забій тварин здійснювали шляхом декапітації. Фракції РХ і ТАХ із клітин печінки виділяли як описано в роботі [9].

Стан процесів ліпоперекиснення та структурну організацію хроматину оцінювали за методами [10–12]. Інтенсивність процесів ПОЛ у хроматині визначали протягом двох годин відповідно до швидкості накопичення малонового діальдегіду (МДА) при спонтанному (неініційованому) (НП) й індукваному НАДФН (НЗП) та аскорбатом (АЗП) ліпоперекисненні. Результати виражали в нмоль МДА/мг білка за 2 год. Для виключення можливого впливу циркадних ритмів на біохімічні показники, що вивчались, досліди проводили в один і той же час доби. Результати антиоксидантного впливу екстрактів з лікарських рослин, що тестували, для наочності наведені на рис. 1, 2 у відсотках до активності контролю, яку приймали за 100%.

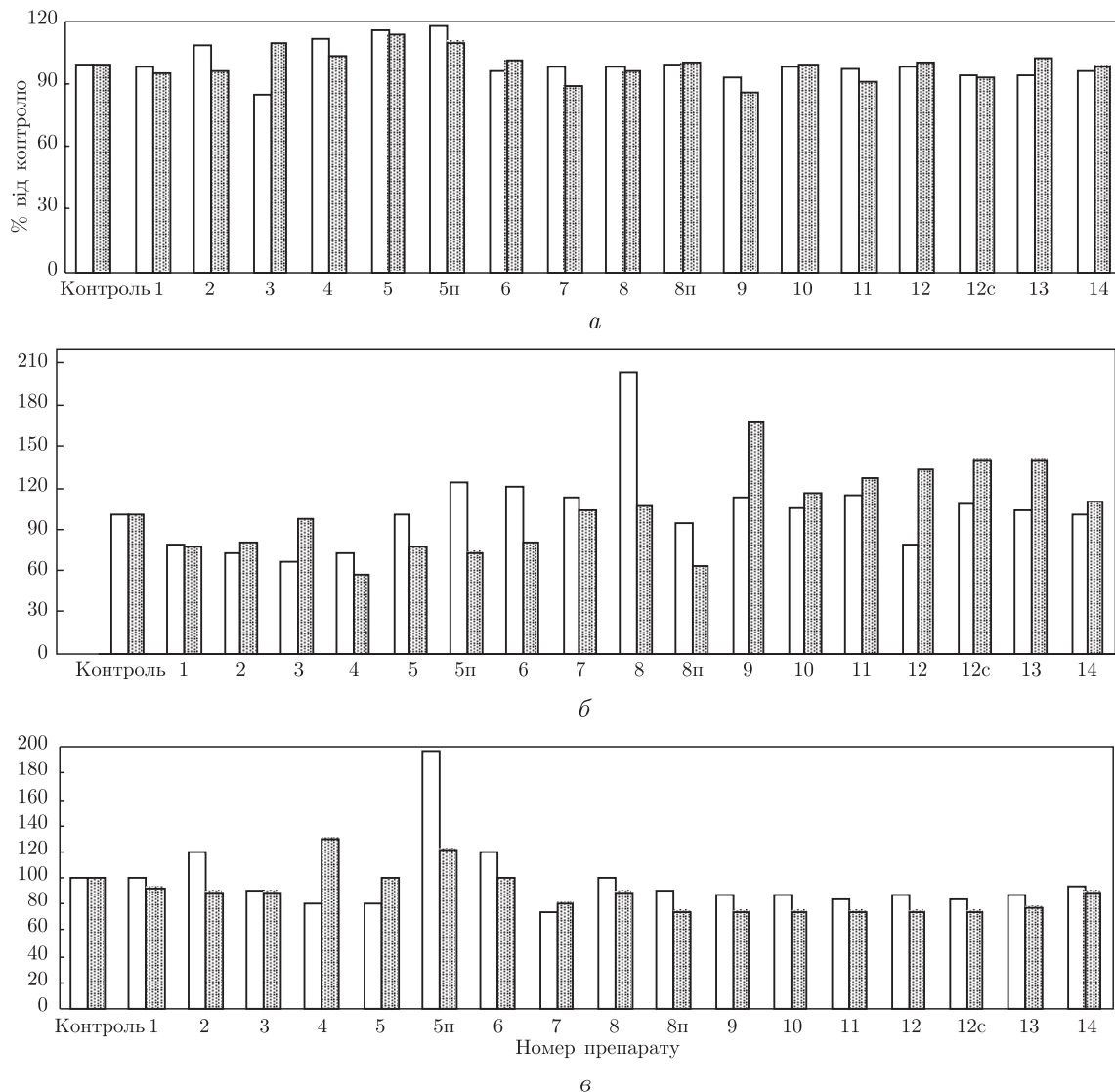


Рис. 2. Вплив досліджених екстрактів у розведеннях 1 : 100 (□) та 1 : 1000 (▣) на активність ПОЛ (за змінами швидкості накопичення МДА) у фракції транскрипційно-активного хроматину печінки щурів за дії тетрахлоретану: а – НЗП; б – АЗП; в – НП

Експериментальні дані обробляли за загальноприйнятими методами непараметричної статистики із використанням критерію Вілкоксона-Уїтні [13]. Розрахунки проводили за допомогою IBM-сумісного комп'ютера за допомогою прикладного пакета програм "Statgraphics".

Встановлено, що швидкість накопичення одного з кінцевих продуктів ПОЛ – МДА – при ініційованому НАДФН ліпопереокисненні у фракції РХ становить для контролю при кінцевому розведенні екстрактів 1 : 100 17613,3 нмоль/мг білка за 2 год, при кінцевому розведенні екстрактів 1 : 1000 – 16970,1 нмоль/мг білка за 2 год (рис. 1, а).

Аналіз одержаних даних показав, що при кінцевому розведенні 1 : 100 достовірно знижують активність НЗП у фракції РХ спиртові екстракти з листків хеномелесу японського (на 11,2%), айви довгастої (на 15,3%), калини звичайної (на 15,5%), лимоннику китайсько-

го (на 17,8%) та шовковиці білої (на 24,5%), яка має максимально виражену антиоксидантну активність. Виражений антиоксидантний ефект виявляє також екстракт з насіння пастернаку посівного, який сприяє зменшенню швидкості накопичення МДА на 22,3% (див. рис. 1, *a*). У кінцевому розведенні 1 : 1000 достовірно знижують швидкість накопичення МДА у фракції РХ при НЗП екстракти елеутерококу колючого (на 10,7%), калини звичайної, маслини багатоквіткової (на 12,8%), обліпихи крушиновидної (на 21,3%), вишні повстистої (на 23,4%), айви довгастої (на 25,3%), шовковиці білої, дерену справжнього, зизифусу справжнього (на 27,7%), актинідиї коломікти (на 29,8%). Максимально активними щодо антиоксидантного впливу виявилися екстракти з листків хеномелесу японського (42,4%), плодів жимолості їстівної (42,6%), насіння пастернаку посівного (44,7%). Таким чином, для фракції РХ найбільш виражений вплив на ініційоване НАДФ-Н ліпоперекиснення чинить екстракт з насіння пастернаку посівного (див. рис. 1, *a*).

При АЗП швидкість накопичення МДА у фракції РХ при кінцевому розведенні екстрактів 1 : 100 становить для контролю 1918,2 нмоль/мг білка за 2 год, а при розведенні 1 : 1000–1804,1 нмоль/мг білка за 2 год (див. рис. 1, *b*).

Серед досліджених зразків у розведенні 1 : 100 достовірно знижують активність АЗП у фракції РХ екстракти вишні повстистої (на 14,9%), лимоннику китайського (на 38,3%), елеутерококу колючого (на 66,6%). При кінцевому розведенні 1 : 1000 швидкість накопичення МДА істотно знижують спиртові екстракти калини звичайної (на 15,9%), бузини чорної (на 18,9 %) і лимоннику китайського (на 34,6%). Тобто максимально виражений антиоксидантний вплив на АЗП у фракції РХ клітин печінки має спиртовий екстракт лимоннику китайського (див. рис. 1, *b*).

За неініційованого ліпоперекиснення швидкість накопичення МДА у фракції РХ для контролю при кінцевому розведенні спиртових екстрактів 1 : 100 становить 1275,8 нмоль/мг білка за 2 год, а при розведенні 1 : 1000 — 1333,5 нмоль/мг білка (див. рис. 1, *в*).

Активність неініційованого ПОЛ у фракції РХ у кінцевому розведенні 1 : 100 достовірно знижують спиртові екстракти з листків хеномелесу японського (на 11,2%), айви довгастої (на 15,3%), калини звичайної (на 15,5%), лимоннику китайського (на 17,8%), шовковиці білої (на 24,5%) та насіння пастернаку посівного (на 22,3%). Швидкість накопичення МДА при НП у фракції РХ у кінцевому розведенні 1 : 1000 знижують спиртові екстракти з листків елеутерококу колючого (на 10,7%), калини звичайної (на 12,8%), маслини багатоквіткової (на 12,8%), обліпихи крушиновидної (на 21,3%), вишні повстистої (на 23,4%), айви довгастої (на 25,3%), шовковиці білої (на 27,7%), зизифусу справжнього (на 27,7%), дерену справжнього (на 27,7%), актинідиї коломікти (на 29,8%), хеномелесу японського (на 42,4%), з плодів жимолості їстівної (на 42,6%), насіння пастернаку посівного (на 44,7%) (див. рис. 1, *в*). Таким чином, на спонтанне ПОЛ у фракції РХ максимально виражений антиоксидантний вплив чинять спиртові екстракти з листків шовковиці білої, айви довгастої та з насіння пастернаку посівного.

Оскільки вільнорадикальне ушкодження хроматину є одним з основних факторів порушення структури спадкового матеріалу [14], то можна вважати, що вказані екстракти з рослин по відношенню до транскрипційно-неактивного хроматину виявляють і генопротекторну активність [8, 15].

Наступним етапом дослідження було вивчення впливу застосованих спиртових екстрактів на активність ПОЛ у транскрипційно-активній фракції хроматину клітин печінки.

При ініційованому НАДФН ліпоперекисненні у фракції ТАХ при кінцевому розведенні спиртових екстрактів 1 : 100 швидкість накопичення МДА становить для контролю

50250,5 нмоль/мг білка за 2 год, а при кінцевому розведенні 1 : 1000 — 48261,1 нмоль/мг білка за 2 год (рис. 2, а).

Аналіз отриманих даних активності НЗП у фракції ТАХ (рис. 2, а) показав, що у кінцевому розведенні 1 : 100 достовірно знижує активність НЗП екстракт елеутерококу колючого, застосування якого сприяє зменшенню швидкості накопичення МДА на 14,7%. У концентрації 1 : 1000 антиоксидантний вплив відносно НЗП чинять екстракти шовковиці білої (на 10,7%) і дерену справжнього (на 13,9%).

При АЗП швидкість накопичення МДА у фракції ТАХ для контролю при кінцевому розведенні екстрактів 1 : 100 становить 2431,5 нмоль/мг білка за 2 год, а при розведенні 1 : 1000 — 2210,4 нмоль/мг білка за 2 год (див. рис. 2, б).

Активність аскорбатзалежного ПОЛ у фракції ТАХ змінюється під впливом розведених 1 : 100 екстрактів обліпихи крушиновидної, хеномелесу японського (на 21,2%), вишні повстистої, лимоннику китайського (на 27,3%), елеутерококу колючого (на 33,3%). У кінцевому розведенні 1 : 1000 вірогідно знижують активність АЗП у фракції ТАХ хроматину клітин печінки екстракти з листків вишні повстистої, бузини чорної (на 20,0%), обліпихи крушиновидної, калини звичайної (на 23,3%), лимоннику китайського (на 43,3%) та з плодів маслинки багатоквіткової (на 26,7%) і жимолості їстівної (на 36,7%) (див. рис. 2, б).

Таким чином, відносно АЗП у фракції ТАХ максимально виражений антиоксидантний ефект виявляють екстракти обліпихи крушиновидної, вишні повстистої, елеутерококу колючого, лимоннику китайського.

Встановлено, що при неініційованому ПОЛ швидкість накопичення МДА у фракції ТАХ для контролю при кінцевому розведенні екстрактів 1 : 100 становить 2290,4 нмоль/мг білка за 2 год, а при розведенні 1 : 1000 — 1989,4 нмоль/мг білка за 2 год (див. рис. 2, в).

Отримані дані свідчать про те, що активність НП у фракції ТАХ у кінцевому розведенні 1 : 100 достовірно знижують екстракти елеутерококу колючого (на 10,0%), дерену справжнього, актинідії коломікти, хеномелесу японського, айви довгастої (на 13,3%), зизифусу справжнього, пастернаку посівного (на 16,7%), лимоннику китайського, калини звичайної (на 20,0%), шовковиці білої (на 26,7%). У кінцевому розведенні 1 : 1000 вірогідно знижують активність НП у фракції ТАХ екстракти з листків вишні повстистої, елеутерококу колючого, маслинки багатоквіткової, шефердії сріблястої (на 11,1%), шовковиці білої (на 18,5%), айви довгастої (на 22,2%), дерену справжнього, актинідії коломікти, зизифусу справжнього, хеномелесу японського, плодів жимолості їстівної, насіння пастернаку посівного (на 25,9%). Таким чином, відносно неініційованого ПОЛ у фракції ТАХ максимальний антиоксидантний вплив в обох розведеннях виявляють екстракти шовковиці білої, зизифусу справжнього та хеномелесу японського (див. рис. 2, в).

Як свідчать одержані результати, досліджені нами рослини мають досить значний вміст БАР і виявляють виражені антиоксидантні та значно рідше — прооксидантні властивості. Максимальний антиоксидантний вплив на спонтанне та ініційоване ПОЛ в обох фракціях хроматину чинять екстракти з листків хеномелесу японського, шовковиці білої, айви довгастої, зизифусу справжнього, елеутерококу колючого, калини звичайної, актинідії коломікти, дерену справжнього та насіння пастернаку посівного. Ці рослини є потенційною сировиною антиоксидантних фітосубстанцій. Достовірно знижують активність аскорбатзалежного ПОЛ в обох фракціях хроматину вишня повстиста, лимонник китайський, елеутерокок колючий, обліпиха крушиновидна, сировина яких (листки) показала високу антиоксидантну генопротекторну активність, тобто саме їх спиртові екстракти виявились найбільш перспективними при створенні фітозасобів для захисту геному.

Вираженість антиоксидантного впливу спиртових екстрактів з фітоматеріалів знаходиться в залежності від вмісту БАР у рослинній сировині. Встановлено, що листки вишні повстистої, лимоннику китайського, елеутерококу колючого, хеномелесу японського, актинїдії коломікти, зизифусу справжнього, повковиці білої, айви довгастої, калини звичайної, дерену справжнього, маслинки багатоквіткової та насіння пастернаку посівного містять значну кількість флавоноїдних речовин, а саме від $(3,6 \pm 0,31)$ до $(8,4 \pm 0,52)$ мг/г флавонолів і від $(2,2 \pm 0,10)$ до $(10,7 \pm 1,64)\%$ дубильних речовин. Сировина цих рослин також відзначається високим вмістом аскорбінової кислоти — від $(54,0 \pm 5,32)$ до $(125,0 \pm 13,09)$ мг.%. Встановлені властивості фітосировини дають підставу для подальшого застосування цих рослин у фармакології та різних галузях медицини для нормалізації прооксидантно-антиоксидантного балансу організму та захисту геному, у тому числі як засобів ергогенної спрямованості за інтенсивних фізичних навантажень.

1. Губський Ю. И., Долго-Сабуров В. Б., Храпак В. В. Химические катастрофы и экология. – Киев: Здоров'я, 1993. – 224 с.
2. Гурина Л. М. Ендогенна інтоксикація та обмежений протеоліз на етапах лікування злоякісних новоутворень: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 1998. – 18 с.
3. Максютіна Н. П., Пилипчук Л. Б. Рослинні антиоксиданти і пектини в лікуванні і профілактиці променевих уражень і детоксикації організму // Фармацевт. журн. – 1996. – № 6. – С. 35–41.
4. Николаевский В. В., Иванов И. К. Антиоксидантные свойства биологически активных веществ растительного происхождения // Актуальные вопросы курортной терапии. – Пятигорск, 1985. – С. 51–53.
5. Иванченко В. А., Гродзинский А. М., Червченко Т. М. и др. Фитоэргономика. – Киев: Наук. думка, 1989. – 296 с.
6. Головка Э., Ахов Л., Дзюба О. Биологически активные вещества высших растений // Олімпійський спорт та спорт для всіх: проблеми здоров'я, рекреації, спортивної медицини та реабілітації: Тези доп. IV Міжнар. наук. конгр. – Київ, 2000. – С. 182.
7. Методы биохимического исследования растений /Под. ред. Л. Я. Ермакова. – Ленинград: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
8. Губський Ю. І., Левцицький Є. Л., Горюшко Г. Г. та ін. Антиоксидантна активність та генопротекторна дія похідної піридин карбонової кислоти – сполуки ПВ-20 за умов ураження тетрахлорметаном // Соврем. проблемы токсикологии. – 2004. – № 3. – С. 49–54.
9. Левцицький Є. Л., Губський Ю. И., Чабанний В. Н. и др. Биохимическая характеристика фракций транскрипционно-активного и репрессированного хроматина печени крыс // Биополимеры и клетка. – 1993. – 9, № 6. – С. 13–21.
10. Левцицький Є. Л., Горюшко Г. Г., Примак Р. Г. та ін. Механізм геномозахисної дії аспірину за умов отруєння щурів тетрахлорметаном // Ліки. – 1998. – № 3. – С. 53–57.
11. Губський Ю. І., Левцицький Є. Л., Горюшко Г. Г. та ін. Взаємодія нових похідних піридинкарбонових кислот з ізольованими фракціями ядерного хроматину клітин печінки інтактних та отруєних тетрахлорметаном щурів // Соврем. проблемы токсикологии. – 2002. – № 2. – С. 26–32.
12. Губський Ю. І., Левцицький Є. Л., Горюшко Г. Г. та ін. Біохімічні механізми геномозахисної дії нових похідних піридинкарбонових кислот за ураження клітин тетрахлорметаном // Укр. біохім. журн. – 2001. – 73, № 5. – С. 100–107.
13. Ашмарин И. П., Васильев Н. Н., Амбросов В. А. Быстрые методы статистической обработки и планирования экспериментов. – Ленинград: Изд-во Ленингр. ун-та, 1975. – 78 с.
14. Губський Ю. І. ДНК ядерного хроматину: вільнорадикальні механізми хімічного пошкодження // Мед. хімія. – 1999. – 1, № 1. – С. 7–14.
15. Губський Ю. І. Вільнорадикальні реакції в ядерному хроматині // Журн. АМН України. – 1995. – 1, № 2. – С. 216–229.

Національний ботанічний сад
ім. М. М. Гршка НАН України, Київ
НДІ Національного університету
фізичного виховання і спорту України, Київ

Надійшло до редакції 18.07.2006