

УДК 615.1:577

## **ДОСЛІДЖЕННЯ ІНГІБУЮЧОГО ВПЛИВУ ФЛОРОГЛЮЦИНОЛУ ТА ГЕСПЕРИДИНУ НА ПРОЦЕС ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ**

**Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Баула О.П., Журавель К.О., Пойда І.О.**

Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, м. Київ, Україна, e-mail: drvib500@gmail.com

---

У статті представлено аналіз сучасних літературних даних та власних досліджень авторів щодо потенційних інгібіторів оксидативного стресу. Розглянуто механізми оксидативного стресу на прикладі вільнорадикального окислення ліпідів та ефект їх оксидативного пошкодження. Досліджено дію флороглюцинолу та гесперидину на сироватку крові людини *in vitro*, як потенційних інгібіторів перекисного окиснення ліпідів. Дослідження проводилися на базі тесту з тіобарбітуровою кислотою, яка реагує з малоновим діальдегідом – продуктом перекисного окислення ліпідів.

---

**Ключові слова:** флороглюцинол, гесперидин, перекисне окислення ліпідів, антиоксиданти, оксидативний стрес, фармакологічна дія.

## **INVESTIGATION OF PHLOROGLUCINOL AND HESPERIDINE INHIBITING EFFLEMENT ON THE LIPID PEROXIDATION**

**Bessarabov V.I., Kuzmina G.I., Baula O.P., Zhuravel K.O., Poida I.O.**

Kyiv National University of Technologies and Design, Department of Industrial Pharmacy, Kyiv, Ukraine, e-mail: drvib500@gmail.com

---

The article presents an analysis of modern literary data and authors' own research on potential antioxidants of oxidative stress. The mechanisms of oxidative stress at the cluster of free radical oxidation of lipids are studied and the effect of their oxidative damage is clarified. Mechanisms of floroglucinol and hesperedine action on human serum *in vitro* as potential inhibitors of lipid peroxidation o are considered. Studies were conducted on the basis of a test with thiobarbituric acid, which reacts with malonic aldehyde - a product of lipid peroxidation.

---

**Keywords:** phloroglucinol, gesperidine, lipid peroxidation, antioxidants, oxidative stress, pharmacological action.

Останнім часом вчені різних спеціальностей приходять до висновку, що в основі багатьох патологічних процесів в організмі, що призводять до різних захворювань, і, в кінцевому підсумку до старіння, лежить одне й те саме явище. Це пошкодження клітинних оболонок та інших структур всередині клітини вільними радикалами кисню.

Процеси вільнорадикального окислення розглядаються як універсальні і загальнобіологічні механізми при розвитку будь-якого виду патології. Окисний стрес є однією з патогенетичних ланок багатьох захворювань.

З окисним стресом пов'язують всі запальні і травматичні ураження мозку, психічні порушення (шизофренія, епілепсія, депресивні стани), хворобу Альцгеймера, ішемічні стани, множинний розсіяний склероз, хворобу Дауна, міастенію, алкоголізм і наркоманію тощо. Старіння організму також протікає на тлі окисного стресу і, відповідно, вільнорадикальні процеси залучають в патофізіологію всі супутні захворювання. Процес старіння характеризується клітинною дегенерацією та порушенням фізіологічних функцій. Наукове співтовариство сформулювало понад 300 теорій, щоб пояснити рушійні сили старіння [7], але жодна з них досі не була доведена до універсальності. Найбільшого поширення набула теорія вільних радикалів [8], висунута Д. Харманом. Дана теорія отримала широке визнання, ставши таким чином одним з провідних пояснень процесу старіння на молекулярному рівні. Відповідно до цієї теорії, причиною порушення функціонування клітин є необхідні для багатьох біохімічних процесів вільні радикали – активні форми кисню, синтезовані головним чином в мітохондріях.

Активні форми кисню – це молекули чи атоми, зовнішня електронна оболонка яких має один чи декілька неспарених електронів, та які внаслідок цього володіють високою реакційною здатністю. При нормальному рівні активні форми кисню в організмі нейтралізуються антиоксидантною системою, але при надмірній кількості починають активно взаємодіяти з клітинами організму,

руйнуючи їх, та викликаючи незворотні зміни в функціонуванні тієї чи іншої системи [9].

Внаслідок окисного стресу в організмі відбувається накопичення токсичних продуктів перекисного окислення ліпідів, які зумовлюють метаболічні порушення в організмі, порушення функціонального стану різних систем і зміни імунного статусу. Найбільш токсичними месенджерами окислювального стресу, здатними поширювати та посилювати окисне ураження, вважаються альдегіди. Серед альдегідів, одержаних шляхом перекисного окислення ліпідів, найбільша увага приділяється малоновому діальдегіду та 4-гідрокси-2-ноненалу.

Оскільки альдегіди мають високу хімічну активність, ссавці розвинули повний набір ферментів, що дозволяють перетворювати їх у менш реактивні хімічні речовини і контролюють внутрішньоклітинні концентрації, що відображає стаціонарний стан між рівнями утворення продуктів перекисного окислення ліпідів і катаболізмом у менш реакційноздатні сполуки. Ферменти супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонзалежні ферменти, та природні антиоксиданти, наприклад прості фенольні сполуки (фенол і продукти його гідроксилування, оксибензойні та оксикоричні кислоти, кумарини, стильбени, токофероли, флавоноїди тощо) формують антиоксидантну систему організму, яка створена для захисту від ушкоджуючої дії вільних радикалів.

Антиоксиданти – хімічні сполуки, механізм дії яких заснований на гальмуванні вільнорадикальних процесів в тканинах організму. Вони гальмують розвиток деструктивних процесів, захоплюючи вільні радикали та надаючи їм водень, а також продукуючи відносно стабільні антиоксидантні радикали з низьким відновним потенціалом. Підвищена стабільність антиоксидантних радикалів пов'язана з резонансною делокалізацією структур, які містять фенольне ядро, чи просторовим екрануванням реакційного центру об'ємними замісниками.

Одними з найбільш перспективних та відомих природних антиоксидантів є сполуки флавоноїдної природи. Активний інтерес до вивчення флавоноїдів викликала дієтична аномалія, що мала назву «французького парадоксу», та вперше була виявлена у французького населення, пізніше знайдена в інших середземноморських популяціях. Епідеміологічні дослідження показали, що багата флавоноїдами дієта та червоне вино, незважаючи на високе споживання жиру населенням, сприяли низькій захворюваності та смертності від серцево-судинних та нейродегенеративних патологій [10].

Таким чином, проведення аналізу механізмів перекисного окислення ліпідів сироватки крові людини *in vitro* з дослідженням антиоксидантної активності флавоноїдних сполук є актуальним завданням для розвитку сучасної фармацевтичної науки та розробки лікарських засобів для лікування хвороб, викликаних вільнорадикальним окисленням біологічних систем організму людини.

**Мета дослідження:** дослідити інгібуючий вплив флороглюцинолу та гесперидину на процес перекисного окислення ліпідів у сироватці крові людини.

#### **Матеріали і методи дослідження.**

Дослідження інгібуючого впливу флороглюцинолу та гесперидину на процес перекисного окислення ліпідів проводилось з використанням стандартного визначення з тіобарбітуровою кислотою [1]. Метод є непрямим та ґрунтується на здатності тіобарбітурової кислоти реагувати з малоновим діальдегідом, проміжним продуктом етапу ензиматичного окислення арахідонової кислоти та кінцевим продуктом окисної деградації ліпідів. Принцип метода полягає у визначенні інтенсивності забарвлення, яке утворюється в ході реакції між малоновим альдегідом та тіобарбітуровою кислотою, що протікає в кислому середовищі та при високій температурі. В результаті реакції утворюється триметиновий комплекс, який має характерний спектр поглинання з максимумом при  $\lambda=535$  нм.

Реактиви, необхідні для проведення експерименту з дослідження

інгібуючого впливу флороглюцинолу та гесперидину на процес перекисного окислення ліпідів: сироватка крові людини (Erba Lachema s.r.o., Чеська Республіка); розчин ортофосфорної кислоти, 2%, рН=1,3; розчин тіобарбітурової кислоти, 0,8%; н-бутанол; флороглюцинолу дигідрат (Alfa Aesar, Германія); гесперидин (Alfa Aesar, Германія).

Для проведення дослідження використовувалось наступне обладнання та допоміжні матеріали: одноканальні автоматичні дозатори 50, 200, 1000 мкл; водяний термостат; водяну баню; центрифугу лабораторну; кварцеві кювети з товщиною оптичного шару 1 см; УФ-спектрофотометр «OPTIZEN POP» (Mecasys, Південна Корея); спирт ізопропіловий; таймер.

### **Результати дослідження.**

Перекисне окислення ліпідів є складним біохімічним процесом, який протікає в тканинах організму і включає в себе активацію та деградацію ліпідних радикалів, вбудовування в ліпіди активованого молекулярного кисню, зміну конфігурації подвійних зв'язків в поліненасичених ацилах ліпідів та, як наслідок, деструкцію мембранних ліпідів та самих мембран. Деструкція мембран, в свою чергу, призводить до смерті клітин та порушенню роботи тих чи інших органів та їх систем. Ферменти антиоксидантної системи організму та хімічні речовини, які володіють антиоксидантними властивостями, зменшують інтенсивність цього процесу. Інгібування процесу перекисного окислення ліпідів різними речовинами дозволяє стверджувати про наявність у них антиоксидантних властивостей. Одними з таких речовин є флороглюцинол та гесперидин.

Флороглюцинол (1,3,5-бензетріол) – органічна, природня сполука, яка представляє собою похідне фенолу. Флороглюцинол являє собою безбарвні кристали, солодкі на смак. Розчинний в органічних розчинниках, у воді розчинний слабо,  $t_{пл}=218,5^{\circ}\text{C}$ ,  $\log P=0,16$ ,  $LD_{50}=5$  г/кг.

Гесперидин – біофлавоноїдний глікозид, який міститься в плодах цитрусових фруктів (найчастіше в апельсинах) і являє собою глікозовану форму

флавоноїду гесперетина. Вперше був ізольований у 1828 році французьким хіміком Лебретеном з білої губчастої частини лимонних і помаранчевих корок. Найбільша кількість гесперидину міститься в плодах рослин *Aurantiaeseae*. Гесперидин являє собою жовті гігроскопічні кристали, без смаку. Розчинний в органічних розчинниках, у воді розчинний слабо,  $t_{пл}=250-255^{\circ}\text{C}$ ,  $\log P=0,05$ ,  $LD_{50}=1$  г/кг.

Флороглюцинол та гесперидин вважаються малотоксичними, тому можуть активно використовуватися в якості активних фармацевтичних інгредієнтів. На сьогодні флороглюцинол активно застосовується для лікування різноманітних патологій шлунково-кишкового тракту, а гесперидин у комбінації з діосміном – для лікування венолімфатичної недостатності (важкість у ногах, біль, нічні судоми, набряки, трофічні порушення, включаючи варикозні виразки) та геморою. Аналіз сучасної літератури підтверджує наявність у флороглюцинола та гесперидина широкого спектра терапевтичних властивостей, серед яких найбільш перспективною є антиоксидантна [2-6].

Результати досліджень інгібуючого впливу флороглюцинолу та гесперидину на процес перекисного окислення ліпідів оцінено за кількістю утворених продуктів взаємодії тіобарбітурової кислоти з малоновим діальдегідом, тобто продуктом перекисного окислення ліпідів. Малоновий діальдегід – один із найпоширеніших продуктів окиснення ліпідів. Він утворюється в організмі при деградації поліненасичених жирів під дією активних форм кисню. Малоновий діальдегід вступає в реакцію з тіобарбітуровою кислотою, яка при високій температурі та кислому значенні рН утворює з ним забарвлений триметиновий комплекс. Малоновий діальдегід становить приблизно 70% від загальної кількості альдегідів, що утворюються при перекисному окисленні ліпідів мембран.

Залежність кількості продуктів перекидного окислення ліпідів сироватки крові людини від концентрацій флороглюцинолу та гесперидину в системі представлено на рисунках 1 та 2 відповідно.

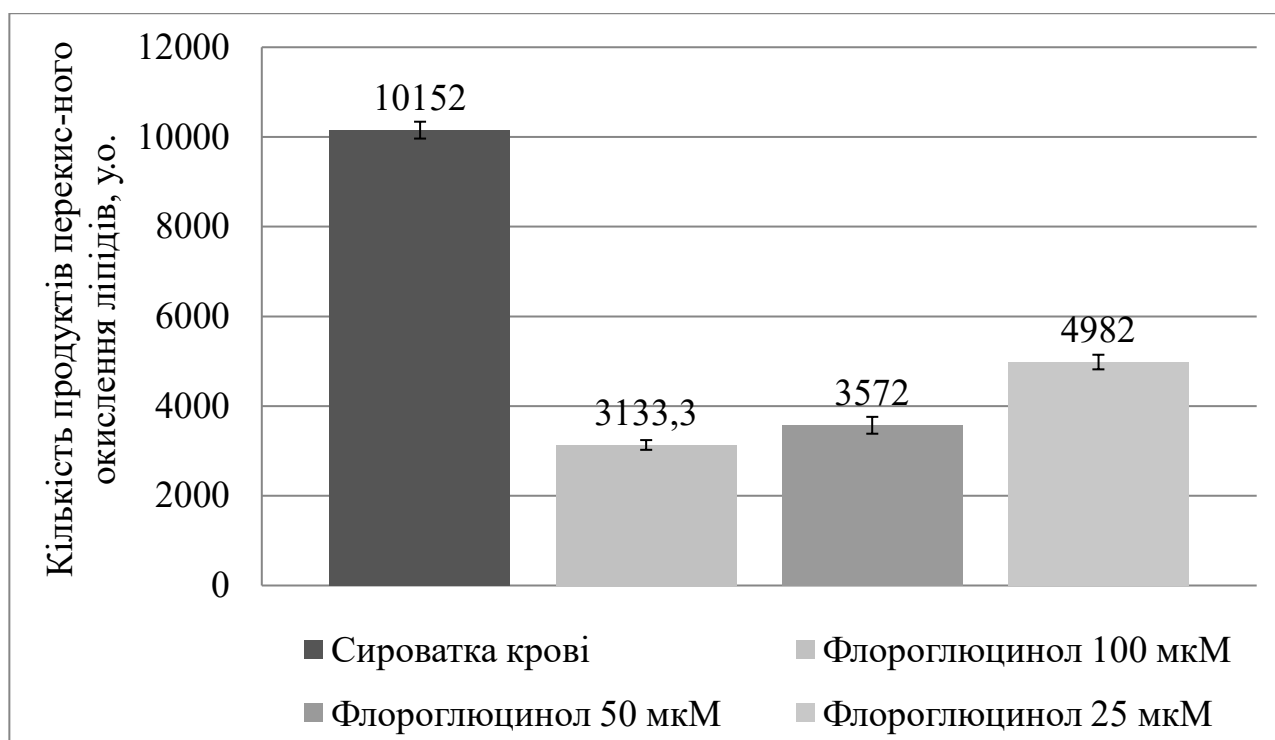


Рисунок 1. Залежність кількості продуктів перекисного окислення ліпідів сироватки крові людини від концентрації флороглюцинолу в системі.

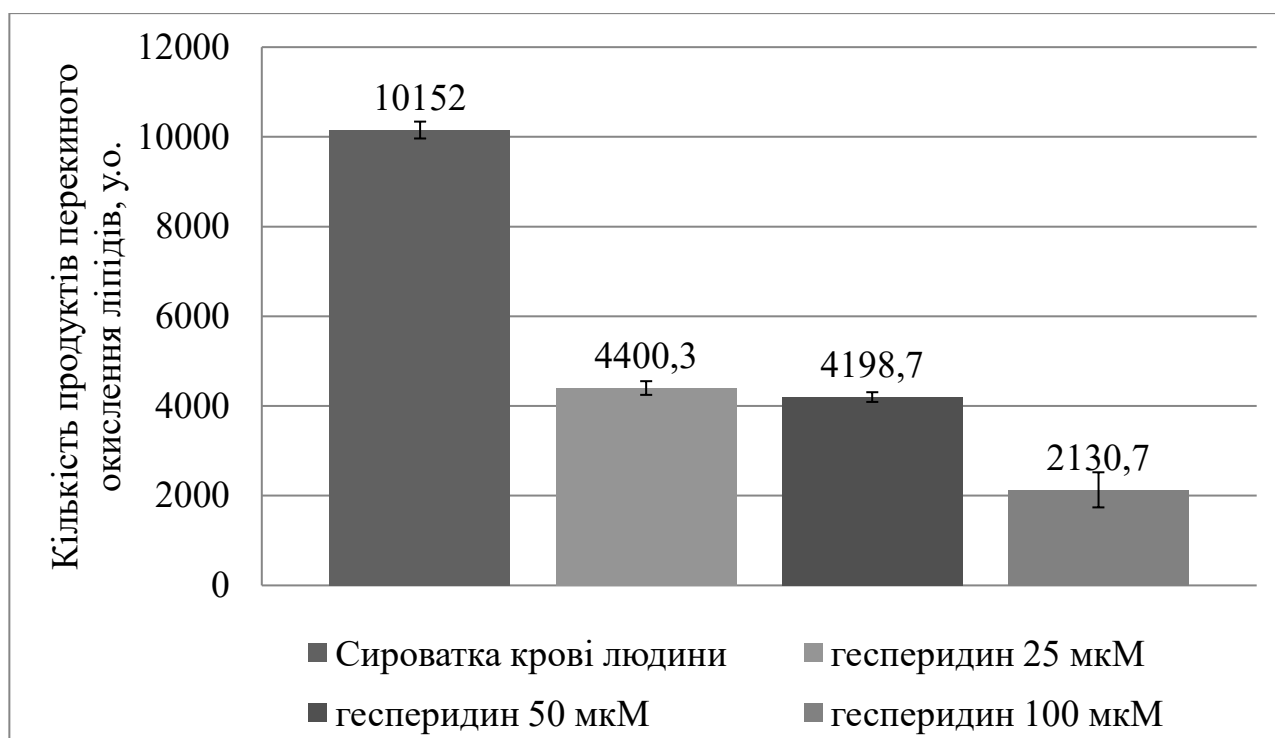


Рисунок 2. Залежність кількості продуктів перекисного окислення ліпідів сироватки крові людини від концентрації гесперидину в системі.

Отримані результати дозволяють стверджувати, що флороглюцинол та гесперидин інгібують перекисне окислення ліпідів сироватки крові людини в умовах *in vitro*, і, таким чином, вірогідно володіють антиоксидантними властивостями.

### **Висновки.**

1. Флороглюцинол пригнічує перекисне окислення ліпідів сироватки крові людини в умовах *in vitro* від 2,00 до 3,25 раза при концентрації від 25 мкМ до 100 мкМ відповідно.

2. Гесперидин пригнічує перекисне окислення ліпідів сироватки крові людини в умовах *in vitro* від 2,30 до 4,80 раза при концентрації від 25 мкМ до 100 мкМ відповідно.

### Список літератури.

1. Арутюнян А.В. Методи оцінки вільнорадикального окислення та антиоксидантної системи організму: методичні вказівки // А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубиніна, Н.Н. Зибіна. – Санкт-Петербург: Фоліант – 2000, 2000. – с. 49-51;
2. Kang, K.A. Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation / K.A. Kang, K.H. Lee, S. Chae, R. Zhang, M.S. Jung, J.S. Ham, L. Baik, J.W. Hyun // J. Cell. Biochem. – 2006. – № 97. – p. 609-620;
3. Quéguineur B. Phloroglucinol: Antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line. Quéguineur B., Goya L., Ramos Z.// Food and Chemical Toxicology. – 2012. – №50. – p. 2886-2893;
4. Goswami S.K. Antioxidant Potential and Ability of Phloroglucinol to Decrease Formation of Advanced Glycation End Products Increase Efficacy of Sildenafil in



- Diabetes-Induced Sexual Dysfunction of Rats./ Goswami S.K., Gangadarappa S.K., Vishwanath M. [et al.] // Sex Med. – 2016. – №4(2). – p. 104-112.
5. Spencer J.P. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites./ Spencer J.P., Kuhnle G.G., Williams R.J., Rice-Evans C.// Biochem J. – 2003. – №372. – p.173–181;
  6. Breinholt V.M. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids./ Breinholt V.M., Offordb E.A., Brouwer C. [et al.] // Food Chem . – 2002. – №40. – p.609–616;2;
  7. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry./ D. Harman // J. Gerontol. – 1956. – №15.– p. 298 – 300;
  8. J. Theories of ageing. / J.Vina, C. Borras, J. Miquel // IUBMB Life. – 2007. – № 59. – p. 249–254;
  9. Esterbauer H. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. / Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. // Free Radic Biol Med. –1992. – № 13(4). – p. 341-90;
  10. Rosenkranz S. Inhibition of the PDGF receptor by red wine flavonoids provides a molecular explanation for the “French paradox”./ Rosenkranz S., Knirel D., Dietrich H.// FASEB J. – 2002. – №16. – p. 1958-1960;

Стаття надійшла до редакції в листопаді 2018 року.