

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЦИТРУСОВОГО ФЛАВОНОЇДУ ГЕСПЕРИДИНУ

**Повshedна І.О., Бессарабов В.І., Кузьміна Г.І., Лісовий В.М.,
Закаблущкий Н.А., Здерко Н.П., Пащенко І.О.**

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

Антиоксиданти – різновид сполук, котрі можуть пригнічувати реакцію окислення вільних радикалів, дія яких призводить до розвитку окиснювального стресу. Результатом тривалого окислювального стресу являється розвиток ряду хронічних захворювань різних етіологій. Антиоксидантні властивості проявляють багато сполук біологічного походження, наприклад ті, які відносяться до класу флавоноїдів. Цікавим для вивчення являється широко відомий цитрусовий біофлавоноїд гесперидин, котрий володіє численними біологічними властивостями, включаючи антиоксидантні. Здатність гесперидину деактивувати вільні радикали дослідили за допомогою проведення реакції інгібування аутоокиснення адреналіну з подальшою спектрофотометричною реєстрацією результатів. Розрахунок констант швидкостей реакцій утворення проміжного продукту аутоокиснення адреналіну при додаванні до досліджуваного розчину ймовірного інгібітора дозволив зробити висновки стосовно впливу підвищення розчинності гесперидину на результати даного дослідю.

Ключові слова: Антиоксидантні властивості, вільнорадикальне окиснення, флавоноїди, гесперидин, інгібування адреналіну

STUDY OF ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THE CITRUS FLAVONOID HESPERIDIN

**Povshedna I.O., Bessarabov V.I., Kuzmina H.I., Lisovyi V.M.,
Zakablutskyi N.A., Zderko N.P., Pashchenko I.O.**

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

Antioxidants are a type of compound that can suppress the oxidation reaction of free radicals, the action of which leads to the development of oxidative stress. The result of prolonged oxidative stress is the development of a number of chronic diseases of various etiologies. Antioxidant properties are exhibited by many compounds of biological origin, such as flavonoids. It is interesting to study is well-known citrus bioflavonoid hesperidin, which has numerous biological properties, including antioxidant. The property of hesperidin to deactivate free radicals was investigated by performing an adrenaline oxidation inhibition reaction followed by spectrophotometric recording of the results. The calculation of the rate constants of the formation of the intermediate product of the oxidation of adrenaline when added to the test solution of a probable inhibitor allowed us to draw conclusions about the effect of increasing the solubility of hesperidin on the results of this experiment.

Key words: Antioxidant properties, free radical oxidation, flavonoids, hesperidin, adrenaline inhibition.

Окислювальний стрес виникає внаслідок дисбалансу між прооксидантними та антиоксидантними захисними системами, які пов'язані з надмірним продукуванням активних форм кисню, включаючи супероксидний радикал, перекис водню та гідроксильний радикал. За нормальних умов вільні радикали генеруються в помірній кількості біологічними системами як побічні продукти метаболізму. Відомо, що в невеликих кількостях активні форми кисню необхідні для нормального протікання багатьох фізіологічних процесів: транскрипції генів, передачі сигналів, фосфорилування білків. Проте, стресові фактори навколишнього середовища, такі як ультрафіолетове та іонізуюче випромінювання, забруднюючі речовини та важкі метали, а також, вживання ксенобіотиків сприяють понаднормовому продукуванню вільних радикалів мітохондріями. Збільшення кількості даних сполук в організмі призводить до ряду шкідливих ефектів, які вони проявляють на білки, ліпіди та нуклеїнові кислоти, внаслідок чого виникають та/або прогресують захворювання різних етіологій, включаючи цукровий діабет, порушення обміну речовин, атеросклероз, онкологічні та серцево-судинні захворювання). Отже, пошук сполук та вдосконалення вже існуючих фармацевтичних композицій для подолання окислювального стресу

являється надзвичайно важливим та перспективним напрямком сучасної фармацевтики.

Як потенційні фармацевтичні агенти для подолання та зменшення наслідків окиснювального стресу можна розглядати фенольні сполуки біологічного походження, такі як гесперидин (далі Hesperidin). Hesperidin являє собою природний флавоноїд, який складається з аглікону – гесперитину сполученого з дисахаридом – рутинозою або неогесперидозою. Міститься Hesperidin переважно в цитрусових. Ряд досліджень показав, що гесперидин проявляє антиоксидантний ефект. Наприклад, японський вчений Маекава стверджує, що Hesperidin може захищати сітківку від пошкодження, пригнічуючи окислювальний стрес та надмірну активацію кальпаїну [3]. В свою чергу, Мін Лі підтвердив, що гесперидин чинить захисний вплив на пошкодження шкіри, спричинене УФ-випромінюванням, шляхом зменшення окиснювального стресу та запалення в клітинах кераноцитів HaCaT [1]. Уейн Янг Лю виявив, що гесперидин може захищати гангліальні клітини сітківки (RGC-5) від пошкоджень, оскільки він володіє властивостями антиоксидантної дії та блокує опосередкований мітохондріями апоптоз [2]. Отже, доцільним є продовження дослідження антиоксидантних властивостей з метою їх подальшого використання в медичній практиці.

Проте, використання Hesperidin як активного фармацевтичного інгредієнта (АФІ) обмежене його поганою розчинністю у полярних розчинниках, що відповідно знижує його біодоступність. Для досягнення кращої розчинності запропоновано введення гесперидину до складу твердої дисперсної системи (далі ТДС) доставки АФІ.

Мета дослідження: дослідження реакції інгібування аутоокиснення адреналіну ТДС різних концентрації.

Матеріал і методи дослідження.

Для проведення дослідження використовували наступні реактиви: гесперидин (Chengdu Okay Pharmaceutical Co., LTD, Китай); полівінілпіролідон К-25 (JH Nanhang Life Sciences CO., Ltd, Китай); Твін-80

(Барва-Фарм, Україна); натрію гідрокарбонат (Массо Organiques s.r.o., Чехія); натрію карбонат (Укроргсинтез, Україна); диметилсульфоксид (Honeywell, Німеччина); 0,18% розчин адреналіну гідротартрату (ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця»», Україна).

Проведення даного дослідження супроводжувалося використанням наступного набору обладнання: УФ–спектрофотометр OPTIZEN POP (Megasys, Південна Корея); кювети з кварцового скла з товщиною оптичного шару 1 см; аналітичні ваги AcuLab 110.4 (Sartorius, Велика Британія); лабораторна установка водопідготовки RO-4 (Warner, Німеччина); установка для отримання води високочистої Sartorius Stedim biotech Arium H₂O pro DI-T (Sartorius, Велика Британія); одноканальні автоматичні дозатори 50, 200, 1000 мкл; пробірки типу Eppendorf на 2 мл; таймер.

Антиоксидантні властивості Нес визначаються його здатністю до інгібування аутоокислення адреналіну. В дослідженні використовували модель хіноїдного окислення адреналіну в лужному середовищі, внаслідок якого утворюється адренохром (рис. 1), що, в свою чергу, сприяє генерації активних форм кисню.

Для визначення утворення стійкого продукту реакції хіноїдного окислення використовували спектрофотометричну реєстрацію за довжини хвилі 345 нм та інгібування в присутності розчину буферу, який забезпечив лужне середовище, та водних розчинів ТДС, яка складалася з Нес, водорозчинного полімеру та неіоногенної ПАР, в концентраціях 25 мкМ, 50 мкМ та 100 мкМ. Вимірювання проводилися протягом 6 хвилин з інтервалом в 15 секунд.

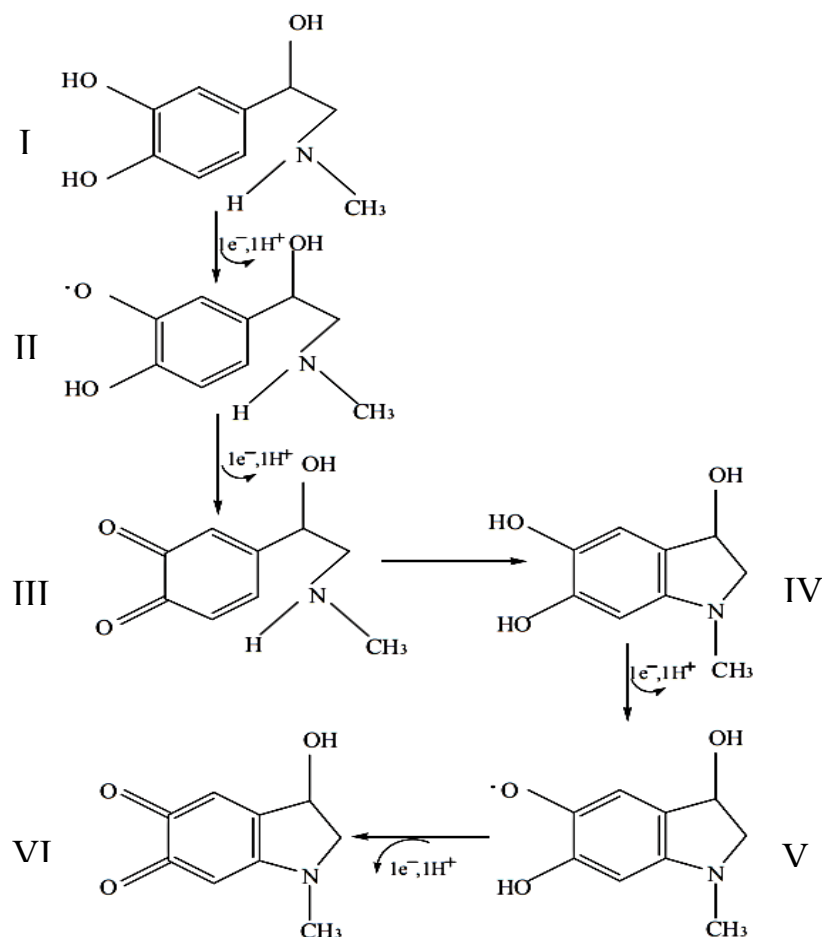


Рисунок 1. Реакція аутоокиснення адреналіну: I – адреналін, II – адреналінсеміхінон, III – адреналінхінон, IV – лейкоадренохром, V – адренохромсеміхінон, VI – адренохром.

Результати дослідження.

В ході обробки експериментальних даних розраховували середні швидкості реакцій та побудували графіки, відповідно до стандартних методик програмного пакету Microsoft Office 365.

Дослідили швидкість реакції утворення проміжного продукту аутоокиснення адреналіну за умови відсутності іншого ймовірного антиоксиданту та в присутності в системі досліджуваних ТДС.

Кількісне вираження швидкостей реакції здійснювалось через розрахунок константи швидкості першого порядку (k_n^1).

На рисунках 2-3 наведено графіки залежності величин констант швидкостей першого порядку від концентрацій досліджуваних речовин для чистого гесперидину та для ТДС.

З графіків видно, що Нес в концентації 100 мкМ зменшує швидкість реакції у 2 рази: $K_H^1(0) = (7,57 \pm 0,79) \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ та $K_H^1(100) = (3,49 \pm 0,31) \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$. Додавання до хімічної системи Нес у складі ТДС в концентрації 100 мкМ знижує швидкість хімічної реакції у 3 рази: $K_H^1(0) = (7,57 \pm 0,79) \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ та $K_H^1(100) = (2,53 \pm 0,32) \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$.

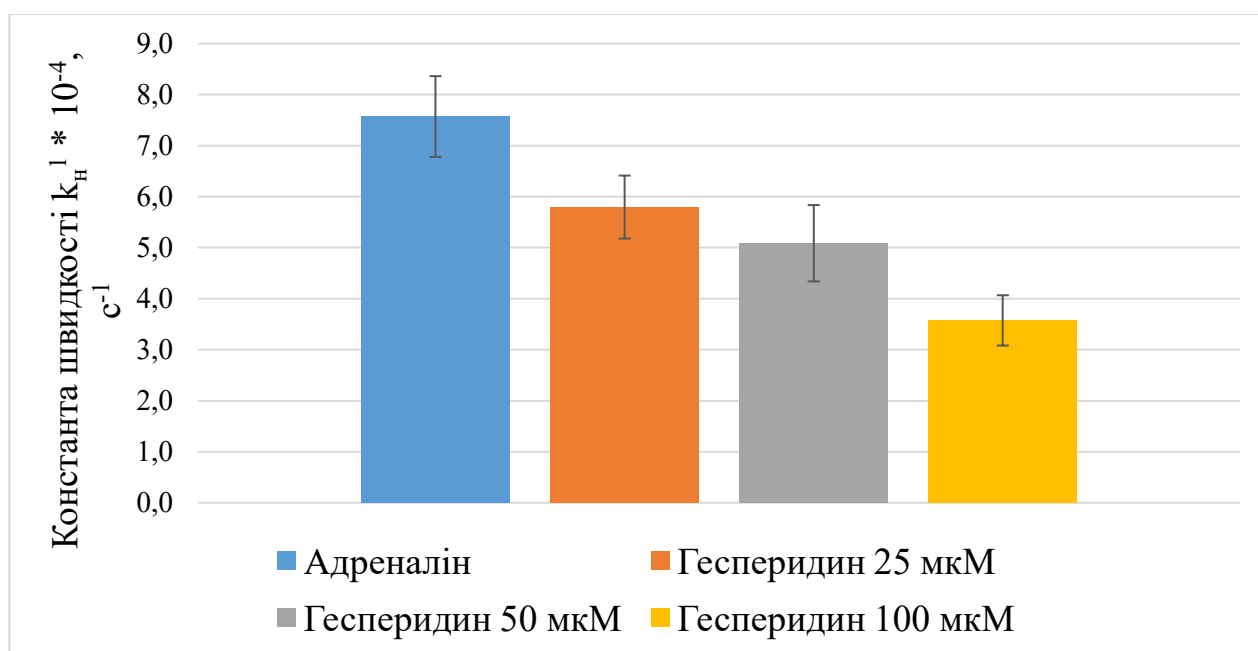


Рисунок 2. Залежність величин констант швидкостей першого порядку аутоокиснення адреналіну від концентрацій чистого гесперидину (25, 50, 100 мкМ).

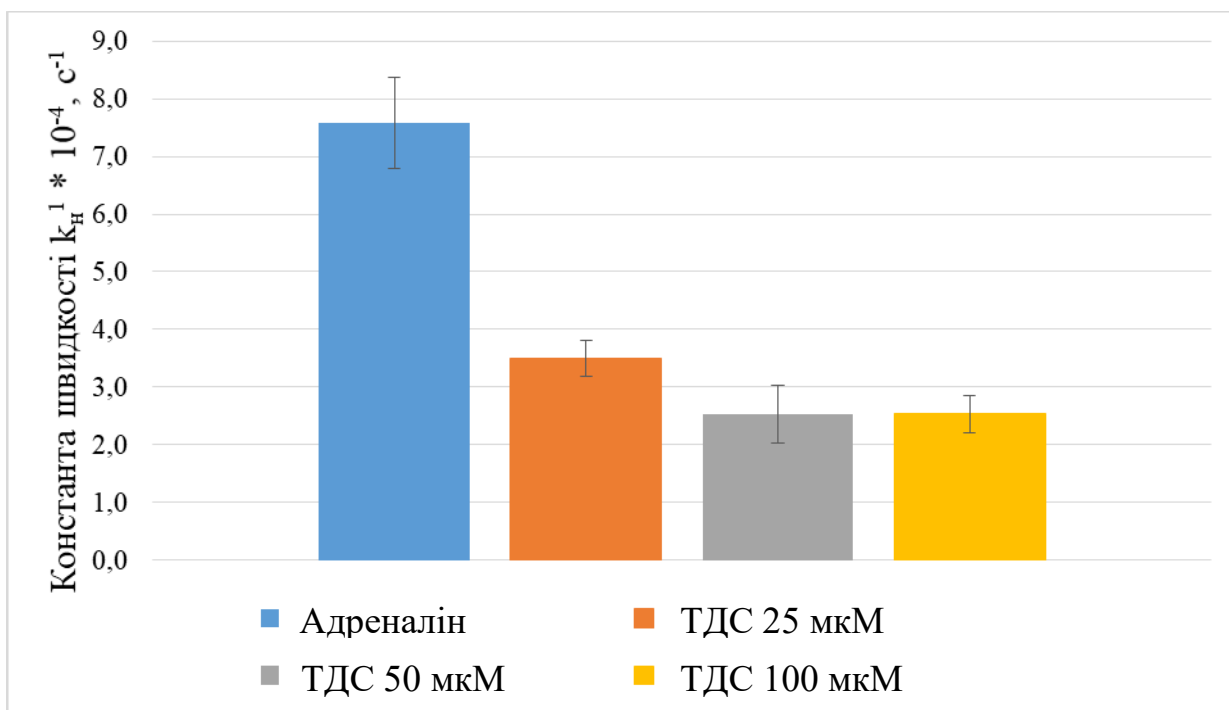


Рисунок 3. Залежність величин констант швидкостей першого порядку аутоокиснення адреналіну від концентрацій ТДС (25, 50, 100 мкМ за гесперидином).

Висновки.

Проведене дослідження показало, що Нес у складі ТДС не лише зберігає свої антиоксидантні властивості, але у 1,5 рази краще інгібує аутоокиснення адреналіну порівняно з чистим Нес. Отже, Нес у складі ТДС можна розглядати як потенційний АФІ для зменшення окиснювального стресу та зменшення наслідків його впливу на організм.

Список літератури.

1. Li M, Lin XF, Lu J, Zhou BR, Luo D. Hesperidin ameliorates UV radiation-induced skin damage by abrogation of oxidative stress and inflammatory in HaCaT cells. *J Photochem Photobiol B.* 2016 Dec;165:240-245. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.10.037. Epub 2016 Nov 1. PMID: 27816646.

2. Liu WY, Liou SS, Hong TY, Liu IM. Protective Effects of Hesperidin (Citrus Flavonone) on High Glucose Induced Oxidative Stress and Apoptosis in a Cellular Model for Diabetic Retinopathy. *Nutrients*. 2017 Dec 2;9(12):1312. doi: 10.3390/nu9121312. PMID: 29207476; PMCID: PMC5748762.
3. Maekawa S, Sato K, Fujita K, Daigaku R, Tawarayama H, Murayama N, Moritoh S, Yabana T, Shiga Y, Omodaka K, Maruyama K, Nishiguchi KM, Nakazawa T. The neuroprotective effect of hesperidin in NMDA-induced retinal injury acts by suppressing oxidative stress and excessive calpain activation. *Sci Rep*. 2017 Jul 31;7(1):6885. doi: 10.1038/s41598-017-06969-4. PMID: 28761134; PMCID: PMC5537259.
4. Сирота Т.В. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы и химических соединений. Пат. 2144674 РФ. МПК G 01N 33/52, G 01N 33/68, № 99103192/14; заявл. 24.02.1999; опубл. 20.01.2000.
5. Державна Фармакопея України 2.0 / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 1. – 1128 с.