

ГЕСПЕРИДИН, ЯК ІНГІБІТОР РУЙНУВАННЯ БІЛКІВ ПРИ ОКСИДАТИВНОМУ СТРЕСІ

Кузьміна Г.І., Бессарабов В.І., Кузьмич М.О., Семенкова І.Л., Мазура С.О.

Київський національний університет технологій та дизайну, кафедра промислової фармації, м. Київ, Україна, e-mail: galina_kuzmina@ukr.net

В статті розглядається дослідження антиоксидантних властивостей гесперидина. Відомо, що оксидативний стрес пов'язаний з прогресуванням нейродегенеративних захворювань, таких як хвороби Альцгеймера, Паркінсона і т.д. В стані оксидативного стресу атаці за рахунок активних форм кисню піддаються в першу чергу білки плазматичних мембран, що призводить до їх деполаризації і лізису клітин. Гесперидин проявляє сильну антиоксидантну дію, при цьому володіє мінімальною токсичністю та проявляє інгібуючий ефект по відношенню до утворених вільних радикалів в стані оксидативного стресу. Гесперидин не тільки знижує рівень оксидативного стресу, а також стимулює ендогенні антиоксидантні механізми захисту. Зроблено висновок, що гесперидин є потенційним активним фармацевтичним інгредієнтом для створення антиоксидантного лікарського засобу для лікування нейродегенеративних захворювань.

Ключові слова: нейродегенеративні захворювання, гесперидин, антиоксидант, інгібітор, оксидативний стрес, перекисне окиснення білків.

HESPERIDIN AS THE INHIBITOR OF PROTEIN DESTRUCTION OF THE OXIDATIVE STRESS

Kuzmina G.I., Bessarabov V.I., Kuzmich M.O., Semenkova I.L., Mazura S.O.

Kyiv National University of Technologies and Design, Department of Industrial Pharmacy, Kyiv, Ukraine, e-mail: galina_kuzmina@ukr.net

The article examines the antioxidant properties of hesperidin. It is known that oxidative stress is connected to a progression of such diseases as Alzheimer's, Parkinson's etc. The proteins of plasma membranes get attacked firstly because of active forms of oxygen, which leads to depolarization and lysis of the cells. Hesperidin shows strong antioxidant effect, while it has the minimal toxicity and also shows the inhibiting effect related to produced free radicals in the state of oxidative stress. Hesperidin stimulates the endogenous antioxidant mechanism of protection, also it reduces the level of the oxidative stress. In the conclusion, the hesperidin is a potential pharmaceutical component for the creating of an antioxidant drug for the treatment of neurodegenerative diseases.

Keywords: neurodegenerative diseases, hesperidin, antioxidant, inhibitor, oxidative stress, peroxide oxidation of proteins.

Нейродегенеративні захворювання є одними з найбільш серйозних хвороб, які характеризуються порушенням функціонування нервової системи організму, внаслідок деструкції нервових клітин та зв'язків.

Велику роль в процесі розвитку нейродегенеративних захворювань відіграє оксидативний стрес – процес в ході якого в тканині накопичується велика кількість вільних радикалів, під дією яких руйнуються клітинні структури [1]. Згідно теорії оксидативного стресу, основною причиною порушення функціонування нервових клітин є окислювальна деструкція білків та перекисне окиснення білків.

Активні форми кисню (АФК), до яких відносяться O_2 , HO_2^- , H_2O_2 , OH^- , утворюються в результаті реакції багатоступиневого відновлення молекулярного кисню. АФК бере участь в метаболічних процесах організму, пов'язаних з обміном ліпідів, білків, нуклеїнових кислот, в синтезі простагландинів, лейкотрієнів, тромбоксанів [2, 3].

Обговорення можливої окиснювальної деструкції білків в організмі до останнього часу носило в основному теоретичний характер. В ряді досліджень цей процес розглядається як одна з причин інактивації ферментів, змін у структурній організації білків в стані оксидативного стресу [4]. В даний час описаний метод оцінки інтенсивності окиснювальної модифікації білків в тканинах, принцип якого заснований на реакції взаємодії окиснених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгіdraзином (2,4-ДНФГ) з утворенням похідних 2,4-динітрофенілгідрозона [5].

Необхідність в розробці ефективних антиоксидантних препаратів і при цьому з інгібуючим ефектом по відношенню до продуктів перекисного окиснення білків вкрай висока. Зважаючи на літературні дані щодо потенційних

антиоксидантних властивостей деяких флавоноїдів, має сенс дослідження активного фармацевтичного інгредієнта гесперидина в цьому напрямку.

Властивості гесперидина широко вивчалися в останнє десятиліття. Гесперидин є однією з найбільш поширених фенольних сполук, що зустрічається в рослинній сировині. Дана речовина проявляє плейотропні біологічні властивості, включаючи антиоксидантну та протизапальну активність. Більше того, він володіє мінімальними побічними ефектами та не володіє цитотоксичністю [6, 7]. Показано, що гесперидин підвищує рівень антиоксидантних ферментів, знижує рівень оксидативного стресу, зменшує кількість запальних маркерів та проапоптичних білків у нейронах [8].

В ряді досліджень, проведених на клітинах тварин та людини, продемонстровано сильну антиоксидантну активність гесперидина [9]. Гесперидин не тільки розщеплює вільні радикали, але також стимулює ендогенні антиоксидантні механізми захисту. Ці механізми включають в себе підвищену активність і виробництво клітинних антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза, гемоксигенази-1, каталази і т.д., а також підвищення рівня клітинного антиоксиданту глутатіона [9, 10].

Зважаючи на роль процесів перекисного окиснення білків в етіології та патогенезі основних нейродегенеративних захворювань у людей літнього та старечого віку, є актуальним проведення подальшого дослідження антиоксидантних та інгібуючих ефектів гесперидина.

Мета дослідження: дослідження антиоксидантних властивостей гесперидина в біологічній моделі, яка представлена бичачим сироватковим альбуміном і окиснювальною системою.

Матеріали і методи дослідження.

Дослідження антиоксидантних властивостей гесперидина проводили базуючись на методиці, згідно якій антиоксидантна активність сполуки визначалася за її здатністю інгібувати перекисне окиснення білків у біологічній

моделі [5]. В якості стандарту порівняння використовували аскорбінову кислоту.

Оцінка антиоксидантних властивостей гесперидина і аскорбінової кислоти проводили за визначенням рівня оптичної густини утвореного продукту, який утворився під час реакції взаємодії окиснених амінокислотних залишків білків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ). Оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів реєстрували спектрофотометрично при різних довжинах хвиль 356, 370, 430 і 530 нм.

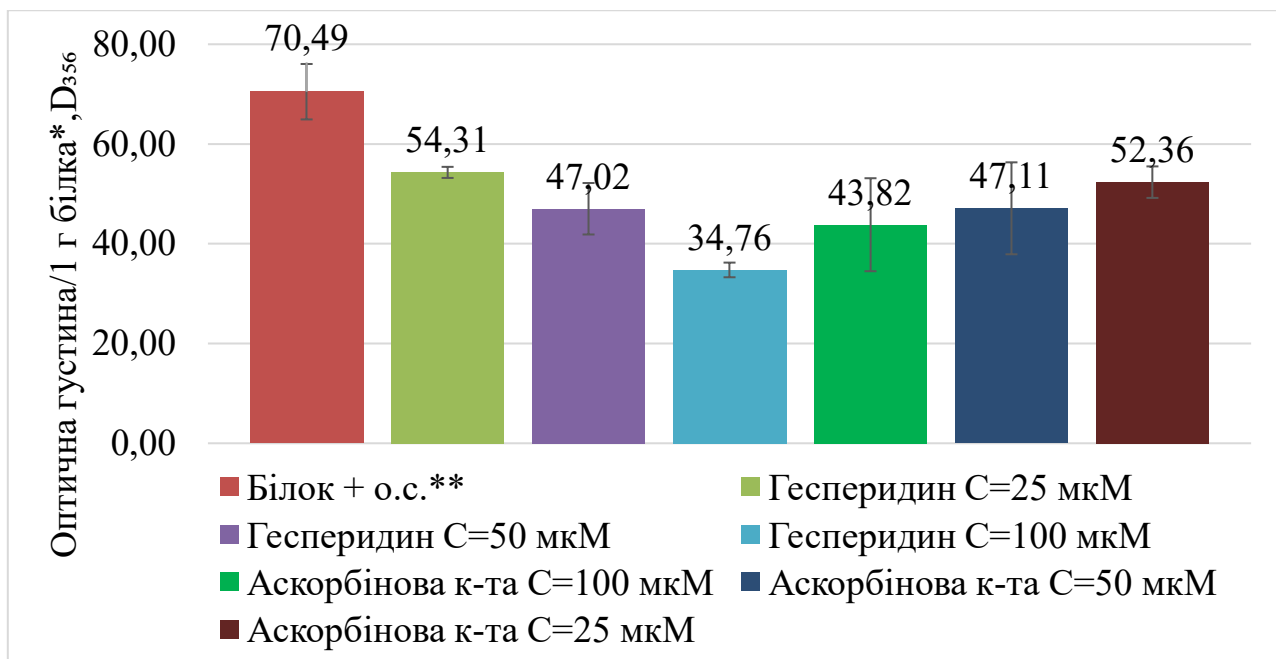
В якості реагентів використовували: бичачий сироватковий альбумін (БСА) (Bio Basic, Канада) розчинений в фосфатному буфері рН=7,6, розчин сульфату заліза 4 мМ, розчин етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) 1 мМ, розчин перекису водню 3 мМ, розчин 2,4-ДНФГ 0,01 М, фосфатний буфер рН=7,6, розчин трихлороцтової кислоти 20%, суміш етилового спирту і етилацетату в співвідношенні 1:1, розчин сечовини 8 М, гесперидин (Chengdu Oka Pharmaceutical Co., LTD, Китай) розчинений в диметилсульфоксиді, аскорбінову кислоту (Sigma, США). Для інкубації проб використовували водяний термостат ТС-200 (Brookfield, США), для центрифугування проб використовували лабораторну центрифугу СМ-3 (Micro Med, Китай). Кінетичні дослідження проводили на УФ-спектрофотометрі Optizen POP (Mecasys, Південна Корея), який облаштовано термостатом (точність термостатування $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$), в кварцевих кюветах з товщиною оптичного шару 1 см при різних довжинах хвиль 356, 370, 430 і 530 нм.

Результати дослідження.

При проведенні дослідження було визначено оптичну густину утворених динітрофенілгідразонів в умовах відсутності ймовірного інгібітора та в присутності в системі гесперидина в концентраціях 25, 50 і 100 мкМ. Для оцінки антиоксидантної активності було використано стандарт порівняння – аскорбінову кислоту, яку додавали в систему в таких же концентраціях.

Як видно з рисунка 1, оптична густина утворених динітрофенілгідразонів

при концентрації гесперидина 25 мкМ у 1,3 рази достовірно менша від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=25$ мкМ – $54,3 \pm 1,1$, а для БСА – $70,5 \pm 5,5$, відповідно ($p < 0,05$). Далі зі збільшенням концентрації гесперидина до 50, 100 мкМ в біологічній моделі оптична густина утворених динітрофенілгідразонів істотно зменшувалася залежно від концентрації. Так оптична густина утворених динітрофенілгідразонів при концентрації гесперидина 50 мкМ у 1,5 рази достовірно менша від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=50$ мкМ – $47,0 \pm 5,2$, а для БСА – $70,5 \pm 5,5$, відповідно ($p < 0,05$). Відповідно оптична густина утворених динітрофенілгідразонів при концентрації гесперидина 100 мкМ у 2 рази достовірно менша від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=100$ мкМ – $34,8 \pm 1,5$, а для БСА – $70,5 \pm 5,5$, відповідно ($p < 0,05$).

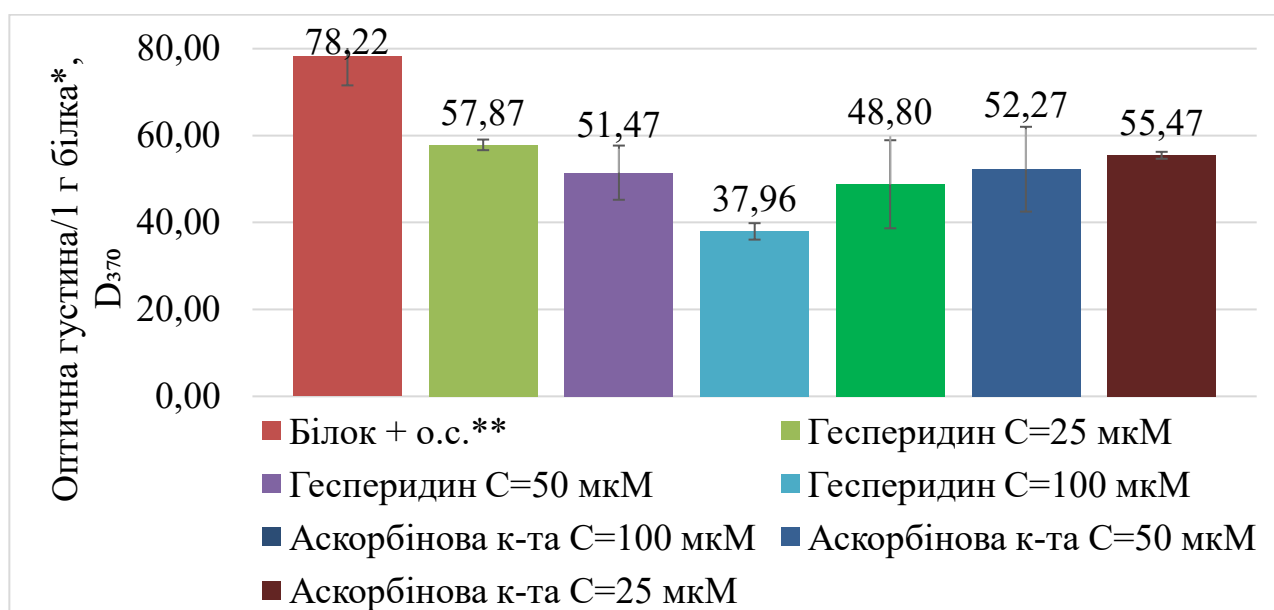


Примітки: *на 1 г білка – перерахунок оптичної густини на 1 г білка;

**о.с. – окиснювальна система.

Рисунок 1. Залежність оптичної густини в перерахунку на 1 г білка при довжині хвилі $\lambda=356$ нм для утворених динітрофенілгідразонів нейтрального характеру від концентрацій гесперидина та аскорбінової кислоти в окиснювальній системі.

Як видно з рисунка 2, оптична густина утворених динітрофенілгідразонів при концентрації гесперидина 25 мкМ у 1,4 рази достовірно менша від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=25$ мкМ – $57,9 \pm 1,2$, а для БСА – $78,2 \pm 6,7$, відповідно ($p < 0,05$). Далі зі збільшенням концентрації гесперидина до 50, 100 мкМ в біологічній моделі оптична густина утворених динітрофенілгідразонів істотно зменшувалася залежно від концентрації. Так оптична густина утворених динітрофенілгідразонів при концентрації гесперидина $C=50$ мкМ у 1,5 разів достовірно менша від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=50$ мкМ – $51,5 \pm 6,2$ а для БСА – $78,2 \pm 6,7$, відповідно ($p < 0,05$). Відповідно оптична густина утворених динітрофенілгідразонів при концентрації гесперидина 100 мкМ у 2,1 рази достовірно менша від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=100$ мкМ – $37,9 \pm 1,9$, а для БСА – $78,2 \pm 6,7$, відповідно ($p < 0,05$).

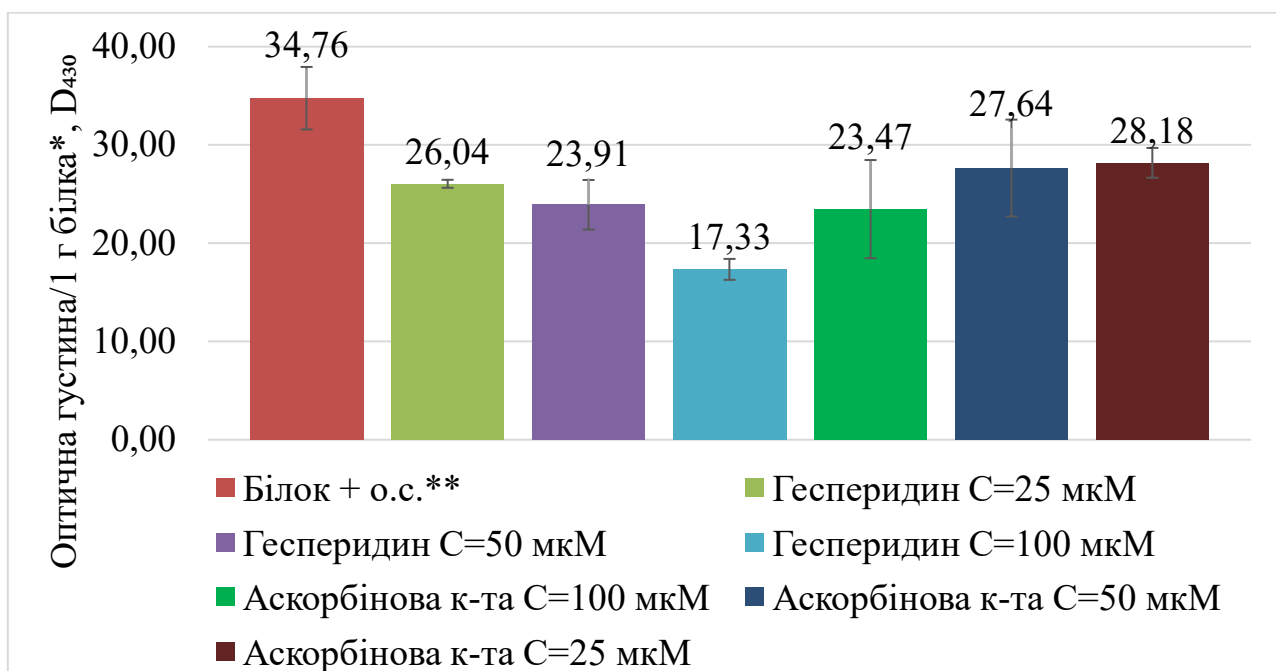


Примітки: *на 1 г білка – перерахунок оптичної густини на 1 г білка;

**о.с. – окиснювальна система.

Рисунок 2. Залежність оптичної густини в перерахунку на 1 г білка при довжині хвилі $\lambda=370$ нм утворених динітрофенілгідразонів нейтрального характеру від концентрацій гесперидина та аскорбінової кислоти в окиснювальній системі.

Як видно з рисунка 3, оптична густина утворених динітрофенілгідразонів при концентрації гесперидина 25 мкМ у 1,3 рази достовірно менша від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=25$ мкМ – $26,0 \pm 0,4$, а для БСА – $34,8 \pm 3,2$, відповідно ($p < 0,05$). Далі зі збільшенням концентрації гесперидина до 50, 100 мкМ в біологічній моделі оптична густина утворених динітрофенілгідразонів істотно зменшувалася залежно від концентрації. Так оптична густина утворених динітрофенілгідразонів при концентрації гесперидина 50 мкМ у 1,5 рази достовірно менша від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=50$ мкМ – $23,9 \pm 2,5$, а для БСА – $34,8 \pm 3,2$, відповідно ($p < 0,05$). Відповідно, оптична густина утворених динітрофенілгідразонів при концентрації гесперидина 100 мкМ у 2 рази достовірно менша від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=100$ мкМ – $17,3 \pm 1,1$, а для БСА – $34,8 \pm 3,2$, відповідно ($p < 0,05$).

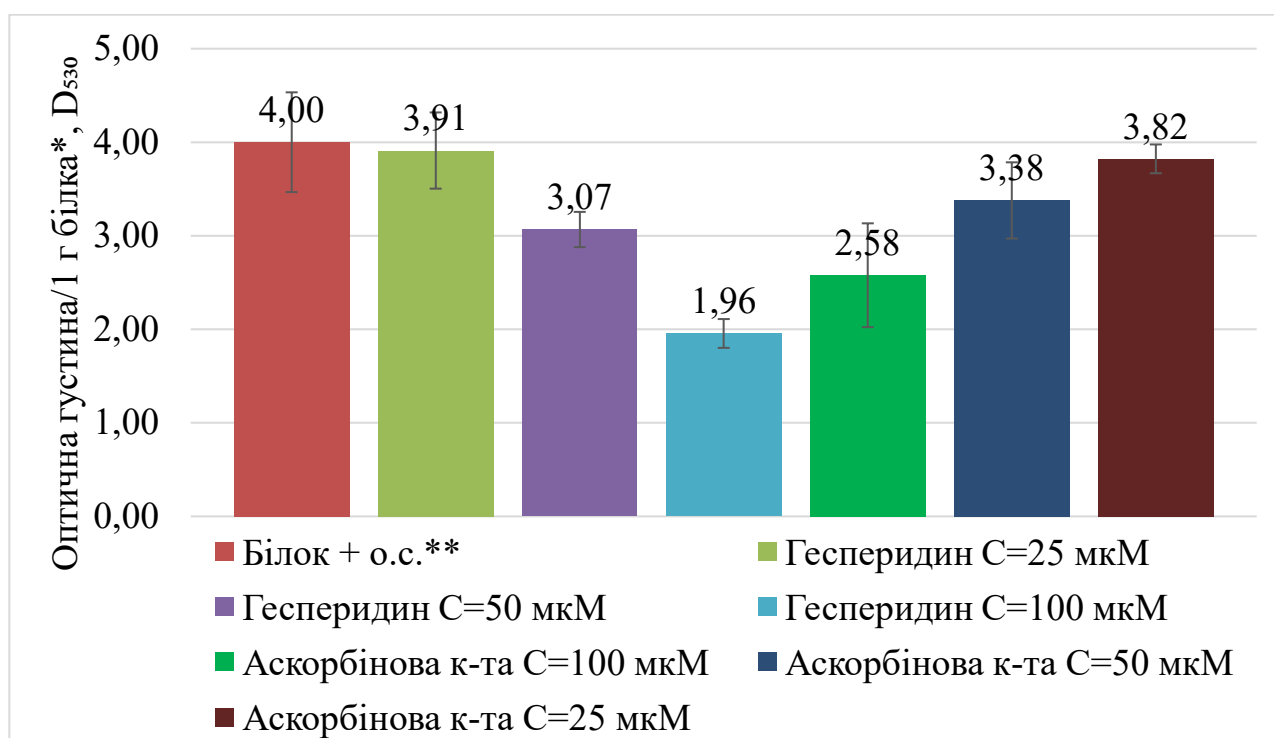


Примітки: *на 1 г білка – перерахунок оптичної густини на 1 г білка;

**о.с. – окиснювальна система.

Рисунок 3. Залежність оптичної густини в перерахунку на 1 г білка при довжині хвилі $\lambda=430$ нм утворених динітрофенілгідразонів основного характеру від концентрацій гесперидина та аскорбінової кислоти в окиснювальній системі.

Як видно з рисунка 4, оптична густина утворених динітрофенілгідразонів при концентрації гесперидина 25 мкМ істотно не відрізняється від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=25$ мкМ – $3,9\pm 0,4$, а для БСА – $4,0\pm 0,5$, відповідно ($p>0,05$). Але зі збільшенням концентрації гесперидина до 50, 100 мкМ в біологічній моделі оптична густина утворених динітрофенілгідразонів істотно зменшувалася. Так оптична густина утворених динітрофенілгідразонів при концентрації гесперидина 50 мкМ у 1,2 рази достовірно менша від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=50$ мкМ – $3,1\pm 0,2$, а для БСА – $4,0\pm 0,5$, відповідно ($p<0,05$). Відповідно, оптична густина утворених динітрофенілгідразонів при концентрації гесперидина 100 мкМ у 2 рази достовірно менша від аналогічного показника для БСА: для гесперидина $C=100$ мкМ – $1,9\pm 0,2$, а для БСА – $4,0\pm 0,5$, відповідно ($p<0,05$).



Примітки: *на 1 г білка – перерахунок оптичної густини на 1 г білка;

**о.с. – окиснювальна система.

Рисунок 4. Залежність оптичної густини в перерахунку на 1 г білка при довжині хвилі $\lambda=530$ нм утворених динітрофенілгідразонів основного характеру

від концентрацій гесперидина та аскорбінової кислоти в окиснювальній системі.

Щоб засвідчити, що гесперидин є ефективним інгібітором перекисного окиснення білків, для порівняння використовували аскорбінову кислоту таких же концентрацій (25, 50 та 100 мкМ), яку додавали до біологічної моделі. З отриманих результатів можна переконатися, що немає істотної різниці між інгібуючим впливом аскорбінової кислоти при цих трьох концентраціях. Гесперидин у концентрації 100 мкМ виявляє інгібуючий вплив на утворені вільні радикали в дослідженій системі більший, ніж аскорбінова кислота в діапазоні концентрацій від 25 до 100 мкМ.

Висновки.

1. При вивченні та дослідженні антиоксидантних властивостей гесперидина доведено, що при додаванні гесперидина в концентраціях 25, 50 та 100 мкМ до біологічної моделі, яка була представлена розчином БСА та окиснювальною системою, гесперидин інгібував перекисне окиснення білків.

2. Гесперидин є потенційним активним фармацевтичним інгредієнтом для створення антиоксидантного лікарського засобу з ефектом інгібування окиснювальної деструкції білкових молекул.

Список літератури.

1. Hikerji S.K. Free radical mechanism of oxidation of uroporphyrinogen in the presence of ferrous iron / S.K. Hikerji, N.R.Pimstone // Arch Biochem Biophys. – 1990. -Vol.281. – P.177-184.
2. Арчаков А.И. / А.И. Арчаков Н.М.Мохосоев // Биохимия - 1989. – Т.54, №2. – 176-179 с.
3. Игуменов В.Л. / В.Л.Игуменов, Б.И.Шаронов, В.А.Пасечник // Биохимия. – 1988. – Т.53,№6. – 925-929 с.

4. Dean R.T. Free radical damage to proteins: the influence of the relative localization of radical generation, antioxidants, and target proteins / R.T.Deam, J.V.Hunt, A.J. Grant et.al. // *Free Radic Biol Med.* – 1991. – Vol.11, №12. – P.161-165.
5. Арутюнян А.В. Методы оценки свободорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А.В.Арутюнян, Е.Е.Дубинина, Н.Н.Зыбина // *Методические рекомендации.* – 2000. – С.104.
6. Xue L. Comparative effects of er-xian decoction, epimedium herbs, and icariin with estrogen on bone and reproductive tissue in ovariectomized rats / L.Xue , Y.Wang, Y. Jiang, T.Han et.al // *Evidencebased complementary and alternative medicine:eCAM.* - 2012. – Art.241416.
7. Yang Y.L. Hesperidin-3'-o-methylether is more potent than hesperidin in phosphodiesterase inhibition and suppression of ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness / Y.L.Yang, H.T.Hsu, K.H.Wang, C.S.Wang et.al // *Evidence-based complementary and alternative medicine:eCAM.* – 2012. – Art.908562.
8. Chiba H. Hesperidin prevents androgen deficiency-induced bone loss in male mice / H.Chiba, H.Kim, A.Matsumoto, S.Akiyama et.al // *Phytother Res.* – 2014. - Vol.28. – P.289-295.
9. Parhiz H. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models // H. Parhiz, A.Roohbakhsh, F.Soltani, R.Rezaee, M.Iranshahi // *Phytother Res.* – 2015. – P.1-7.
10. Khedr N.F. Protective effect of mirtazapine and hesperidin on cyclophosphamide-induced oxidative damage and infertility in rat ovaries / N.F.Khedr // *Exp Biol Med (Maywood).* – 2015. – P.1-8.

Стаття надійшла до редакції в листопаді 2018 року.