

УДК 615.322:612.085.1

<https://doi.org/10.24959/ubphj.18.197>

К. В. СТРЕЛЬЧЕНКО, А. В. МАЛОШТАН, А. О. КРАСНОЩОК

Національний фармацевтичний університет

ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ З РІЗНИХ ЧАСТИН ПЛОДІВ ВИНОГРАДУ СПРАВЖНЬОГО ПРИ ІНСУЛІНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ

Актуальність. Стан механізмів антиоксидантного захисту нашого організму відіграє важливу роль у патогенезі захворювань (ішемічна хвороба серця та інсульт), які згідно зі статистикою ВООЗ є основними причинами смертності в світі. Часто дані захворювання розвиваються на тлі цукрового діабету.

Мета дослідження. Метою даного дослідження було порівняльне вивчення *in vivo* впливу поліфенольних екстрактів з різних частин плоду Винограду справжнього (м'якоть, шкірка і насіння) на активність ферментів антиоксидантного захисту печінки, вміст антиоксидантів і процеси перекисного окиснення ліпідів у ній.

Матеріали та методи. Інсулінорезистентність модулювали утриманням тварин на раціоні з високим вмістом фруктози. Вивчали вплив поліфенольних екстрактів з м'якоті, шкірки та насіння плодів Винограду справжнього на антиоксидантний захист печінки щурів; оцінювали вплив за такими показниками: активність каталази, супероксиддисмутази, вміст відновленого глутатіону, α -токоферолу, а також досліджували вплив на процеси перекисного окиснення ліпідів.

Результати та їх обговорення. Експериментально встановлено статистично достовірний позитивний вплив застосування ПФЕ з різних частин плодів Винограду справжнього при ранніх стадіях інсулінорезистентності, спричиненої високим вмістом фруктози в дієті.

Висновки. Більш виражену антиоксидантну дію *in vivo* мають поліфенольні екстракти з насіння та шкірки плодів Винограду справжнього порівняно з ПФЕ з м'якоті.

Ключові слова: Виноград справжній; антиоксидантна дія; поліфенольні екстракти; інсулінорезистентність

K. Strelchenko, A. Maloshtan, A. Krasnoshchok

A comparative study of polyphenolic extracts antioxidant activity from different parts of fruit *Vitis vinifera* at insulin resistance.

Topicality. The state of antioxidant defense mechanisms of our body plays an important role in the pathogenesis of diseases (ischemic heart disease and stroke), which according to WHO statistics are the main causes of mortality in the world. Often, these diseases are developed on the background of diabetes mellitus.

Aim. The purpose of this study was to compare the study (*in vivo*) of polyphenolic extracts effects from different parts of this grape fruit (flesh, peel and seeds) on the antioxidant liver enzymes activity, the antioxidants presence, and the processes of lipids peroxide oxidation in it.

Materials and methods. Insulin resistance was modulated by a high-fructose diet. The influence of polyphenolic extracts from pulp, skins and seeds on antioxidant protection in liver of rats was studied; the effect was evaluated on the following indicators: catalase activity, superoxide dismutase activity, the content of reduced glutathione, α -tocopherol, and the effect on lipid peroxidation processes was investigated.

Results and discussion. There has been experimentally established a statistically significant positive use effect of the PFE from different parts of *Vitis vinifera* in the early stages of insulin resistance caused by high fructose diet.

Conclusions. Polyphenolic extracts from peel and grape seeds have more significant antioxidant effect *in vivo* compared to polyphenolic extracts from pulp.

Key words: *Vitis vinifera*; antioxidant activity; polyphenolic extract; insulin resistance

К. В. Стрельченко, А. В. Малоштан, А. А. Краснощек

Сравнительное изучение антиоксидантной активности полифенольных экстрактов из разных частей плодов Винограда культурного при инсулинорезистентности

Актуальность. Состояние механизмов антиоксидантной защиты нашего организма играет значимую роль в патогенезе заболеваний (ишемическая болезнь сердца и инсульт), которые согласно статистике ВОЗ являются основными причинами смертности в мире. Часто данные заболевания развиваются на фоне сахарного диабета.

Цель исследования. Целью данного исследования было сравнительное изучение *in vivo* влияния полифенольных экстрактов из разных частей плодов Винограда культурного (мякоть, кожица и семена) на активность ферментов антиоксидантной защиты печени, содержание антиоксидантов и процессы перекисного окисления липидов в ней.

Матеріали і методи. Інсулінорезистентність модулювалась содержанием животних на раціоне с высоким содержанием фруктозы. Изучали влияние полифенольных экстрактов из мякоти, кожицы и семян плодов Винограда культурного на антиоксидантную защиту печени крыс; оценивали влияние по таким показателям: активность каталазы, супероксиддисмутаза, содержание восстановленного глутатиона, α -токоферола, а также исследовали влияние на процессы перекисного окисления липидов.

Результаты и их обсуждение. Экспериментально установлено статистически достоверное положительное влияние применения ПФЭ из разных частей плодов Винограда культурного при ранних стадиях инсулинорезистентности, вызванной высоким содержанием фруктозы в диете.

Выводы. Более выраженным антиоксидантным действием *in vivo* обладают полифенольные экстракты из семян и кожицы плодов Винограда культурного в сравнении с ПФЭ из мякоти.

Ключевые слова: Виноград культурный; антиоксидантное действие; полифенольные экстракты; инсулинорезистентность

ВСТУП

Одним з показників якості життя населення та рівня соціально-економічного розвитку країн є середня тривалість життя. Істотно на даний параметр можна вплинути, знизивши відсоток основних причин смертності, якими за даними ВООЗ є ішемічна хвороба серця та інсульт [1].

Проаналізувавши біографію деяких довгожителів було відзначено, що частина з них проживала в гірській місцевості, а раціон харчування багатьох містить продукти, багаті на антиоксиданти. В обох випадках знижується негативний вплив вільних радикалів на організм.

З огляду на роль вільнорадикального окиснення в патогенезі атеросклерозу, наслідками якого можуть бути згадувані вище судинні захворювання, логічним є створення препарату на основі антиоксидантів для профілактичного застосування і зниження ймовірності розвитку атеросклерозу.

Об'єктом дослідження було обрано плоди Винограду справжнього, в складі яких окрім інвертного цукру, сахарози, органічних кислот, дубильних речовин, амінокислот, вітамінів групи В, вітамінів С, Е, Н, стеринів і мінеральних солей також містяться поліфенольні сполуки, такі як антоціани, флавоноли (катехіни і проантоціанідини), дигідрофлавоноли, стильбени і фенольні кислоти, які і є основними біологічно активними компонентами, відповідальними в тому числі за протизапальну і антиоксидантну активність екстрактів даних плодів [2].

Метою даного дослідження було порівняльне вивчення *in vivo* впливу поліфенольних екстрактів (ПФЕ) з різних частин плоду Винограду справжнього (м'якоть, шкірка і насіння) на активність ферментів антиоксидантного захисту печінки, вміст антиоксидантів і процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в ній для оцінки доцільності лікувально-профілактичного застосування ПФЕ з плодів Винограду справжнього на ранніх стадіях інсулінорезистентності.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти проводили на білих безпородних самицях щурів масою 180 ± 15 г у кількості 30 особин, які були розділені на 5 груп (по 6 щурів у кожній). Перша група – інтакт утримувалася на стандартно-

му раціоні віварію НФаУ. В інших чотирьох групах модулювали інсулінорезистентність: друга група – контроль, третя, четверта і п'ята групи отримували ПФЕ з м'якоти, шкірки і насіння плодів Винограду справжнього.

Інсулінорезистентність модулювали утримуванням тварин на дієті, збагаченій фруктозою (60,3 % фруктози, 18,3 % білка, 5,2 % жиру), що супроводжувалося розвитком ожиріння, порушенням вуглеводного та ліпідного видів обміну [3].

Тварин розділили на групи: 1 група – інтактні тварини; 2 група – інсулінорезистентність (ІР); 3 група – тварини з ІР, яким впродовж останніх 14 діб експерименту вводили ПФЕ з м'якоти в дозі 10 мг поліфенолів на 100 г маси тіла тварин; 4 група – тварини з ІР, яким впродовж останніх 14 діб експерименту вводили ПФЕ зі шкірки в дозі 10 мг поліфенолів на 100 г маси тіла тварин; 5 група – тварини з ІР, яким впродовж останніх 14 діб експерименту вводили ПФЕ з насіння в дозі 10 мг поліфенолів на 100 г маси тіла тварин.

Експеримент проводили, дотримуючись «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001) [4], гармонізованих з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей». Декапітація тварин проходила під хлорозоло-уретановим наркозом. Печінку перфузували фізіологічним розчином на холоді і готували 10 %-ий гомогенат на 50 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4), що містить 50 мМ NaCl.

Для визначення гідроперекисів ліпідів після осадження білків трихлорооцтовою кислотою ліпіди екстрагували етанолом з подальшою взаємодією з тіоціанатом амонію та спектрофотометричним визначенням оптичної густини при довжині хвилі 480 нм [5].

Вміст ТБК-реактивних визначали методом Стальної І. Д. [6], принцип якого полягає в тому, що за високої температури в кислому середовищі малонового діальдегід реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при спектрофотометруванні при довжині хвилі 532 нм.

Вимірювали оптичну густину гептан-ізопропанольних екстрактів вказаних фракцій при довжині хвилі 232 нм (для ДК) та 278 нм (для КД + СТ) [7].

Таблиця 1

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ З РІЗНИХ ЧАСТИН ПЛОДІВ ВИНОГРАДУ СПРАВЖЬОГО НА ПРОЦЕСИ ПОЛ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ, (n = 6, M ± m)

Тип екстракту	ДК, УО/мг б.	КД + СТ, Е/мг б.	Гідроперекиси ліпідів, ОДЕ/мг б.	ТБК-РП, нмоль/мг б.
Інтакт	0,340 ± 0,013	9,54 ± 0,14	1,05 ± 0,031	13,05 ± 0,39
Контроль	0,659 ± 0,066*	16,73 ± 2,01*	2,17 ± 0,067*	18,05 ± 0,77*
ПФЕ з м'якоті плодів	0,521 ± 0,038**	9,72 ± 0,55**	1,41 ± 0,044	14,84 ± 0,21**
ПФЕ зі шкірки	0,402 ± 0,029**	8,66 ± 0,41**	1,15 ± 0,021**	13,70 ± 0,37**
ПФЕ з насіння	0,396 ± 0,031**	8,66 ± 0,37**	1,25 ± 0,024**	12,09 ± 0,99**

Примітка: * – відхилення достовірне відносно Інтакту ($p \leq 0,05$); ** – відхилення достовірне відносно групи фруктози ($p \leq 0,05$).

Вміст α -токоферолу визначали за реакцією з дво-валентним залізом (індикатор α, α' -біпіридил) [8]. Вміст відновленого глутатіону визначали за реакцією з алоксаном [9].

Активність каталази [КФ 1.11.1.6] визначали методом Королюк М. А. та співавт., 1988 [10], принцип якого засновано на здатності пероксиду водню утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс. Активність досліджуваного ферменту визначають спектрофотометрично при довжині хвилі 410 нм.

Визначення активності супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] проводили стандартним методом, принцип якого полягає в здатності адреналіну аутоокиснюватися у лужному середовищі з генерацією супероксиданіонрадикалу з певною швидкістю, що зменшується у присутності СОД. Порівняння швидкостей аутоокиснення адреналіну та окиснення останнього у присутності СОД дозволяє визначити активність ферменту у досліджуваній пробі [11].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакету програм «STATISTICA 10.0». з використанням t-критерію Стьюдента для порівняння незалежних вибірок при рівні вірогідності $p < 0,05$ [12].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як видно з результатів експерименту, наведених в табл. 1, дієта з високим вмістом фруктози негативно вплинула на ПОЛ у печінці щурів, інтенсифікувавши їх, зокрема: кількість ДК збільшилася на 93,8 %, КД та СТ – на 75,4 %, гідроперекисів ліпідів – на 106 %, а ТБК-реактантів – на 38,3 %. Супутнє застосування ПФЕ з плодів винограду справжнього значно зменшувало ці показники. Зокрема: ПФЕ з м'якоті, шкірки та насіння знижували вміст ДК на 20,9 %, 39,0 % та 39,9 % відповідно порівняно з контрольною групою. Вміст КД та СТ знижувався на 41,9 %, 48,2 %, 48,2 %, а ТБК-РП на 17,8 %, 24,1 %, 33 % при застосуванні ПФЕ з м'якоті, шкірки та насіння відповідно.

На цьому етапі експерименту найкраще проявили себе ПФЕ зі шкірки та насіння плодів винограду справжнього, майже не поступаючись один одному.

Відповідно до результатів, наведених у табл. 2, визначення кількості відновленого глутатіону показало

Таблиця 2

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ З РІЗНИХ ЧАСТИН ПЛОДІВ ВИНОГРАДУ СПРАВЖЬОГО НА ВМІСТ АНТИОКСИДАНТІВ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ, (n = 6, M ± m)

Тип екстракту	Відновлений глутатіон, мкмоль/мг б.	α -токоферол, нмоль/мг б.
Інтакт	1,32 ± 0,16	35,73 ± 0,47
Контроль	0,47 ± 0,09*	19,50 ± 0,57*
ПФЕ з м'якоті плодів	1,00 ± 0,21**	27,85 ± 1,39**
ПФЕ зі шкірки	1,28 ± 0,12**	29,75 ± 0,79**
ПФЕ з насіння	1,32 ± 0,22**	33,41 ± 1,67**

Примітка: * – відхилення достовірне відносно Інтакту ($p \leq 0,05$); ** – відхилення достовірне відносно групи фруктози ($p \leq 0,05$).

ло зниження його на 64,4 % при контрольній патології порівняно з інтактом та нормалізацію кількості відновленого глутатіону при супутньому застосуванні ПФЕ зі шкірки та насіння, а також зменшення негативного

Таблиця 3

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ З РІЗНИХ ЧАСТИН ПЛОДІВ ВИНОГРАДУ СПРАВЖЬОГО НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ, (n = 6, M ± m)

Тип екстракту	Активність каталази, мкКат	Активність СОД, пит. од/мг
Інтакт	3,98 ± 0,43	0,89 ± 0,09
Контроль	2,26 ± 0,12*	0,37 ± 0,07*
ПФЕ з м'якоті плодів	3,61 ± 0,42**	0,67 ± 0,05**
ПФЕ зі шкірки	3,40 ± 0,42**	0,80 ± 0,06**
ПФЕ з насіння	3,78 ± 0,39**	0,65 ± 0,04**

Примітка: * – відхилення достовірне відносно Інтакту ($p \leq 0,05$); ** – відхилення достовірне відносно групи фруктози ($p \leq 0,05$).

впливу при супутньому застосуванні ПФЕ з м'якоті до 24,2 %. Вміст α -токоферолу при контрольній патології знижувався на 45,4 % порівняно з інтактом. Супутнє застосування ПФЕ з м'якоті, шкірки та насіння знижували негативний вплив фруктозної дієти на вміст α -токоферолу до 22,1 %, 16,7 % та 6,5 % відповідно.

Заключний етап експерименту полягав у дослідженні змін активності каталази та СОД (результати наведені в табл. 3). Активність каталази та СОД при контрольній патології знижувалась на 43,2 % та 58,4 % відповідно порівняно з інтактом. Порівняно з контрольною групою: застосування ПФЕ з м'якоті збільшувало активність каталази та СОД на 59,7 % та 81,1 %; застосування ПФЕ зі шкірки збільшувало активність каталази та СОД на 50,4 % та 116,2 %, а застосування ПФЕ з насіння – 67,3 % та 75,7 % відповідно.

Різний вплив на активність наведених ферментів пояснюється відмінностями в якісному складі поліфенольних сполук екстрактів з різних частин плодів Винограду справжнього.

ВИСНОВКИ

1. Експериментально встановлено статистично достовірний позитивний вплив застосування ПФЕ з різних частин плодів Винограду справжнього при ранніх стадіях інсулінорезистентності, спричиненої високим вмістом фруктози в дієті.
2. Виходячи з вищезазначених даних, можна підсумувати більш виражену антиоксидантну дію *in vivo* ПФЕ з насіння та шкірки плодів Винограду справжнього порівняно з ПФЕ з м'якоті.

Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. World Health Organization. Mortality Database. – Available at : http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/index.html
2. Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content / J. A. Rothwell, J. Perez-Jimenez, V. Neveu et al. // DATABASE. – 2013. – Vol. 2013. <https://doi.org/10.1093/database/bat070>
3. Endothelial dysfunction in high fructose containing diet fed rats: increased nitric oxide and decreased endothelin-1 levels in liver tissue / M. Altaş, A. Var, K. Özbilgin et al. // Dicle University Med. School. – 2010. – Vol. 37, № 3. – P. 193–198.
4. Резніков, О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах. Перший національний конгрес з біоетики / О. Г. Резніков // Ендокринолог. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142–145.
5. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / Л. В. Андреева, Н. І. Вербицький, О. І. Віщур та ін. – Львів, 2004. – 399 с.
6. Стальная, И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М. : Медицина, 1977. – С. 66–68.
7. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И. Ф. Волчегорский, А. Г. Налимов, Б. Г. Яровинский, Р. И. Лифшиц // Вопр. мед. химии – 1989. – № 1. – С. 127–131.
8. Speake, B. K. Comparative biochemistry and physiology / B. K. Speake, P. F. Surai, R. C. Noble. – 1999. – Pt. B124. – P. 101–107.
9. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М. И. Прохоровой. – Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – С. 183–186.
10. Королюк, М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
11. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / Л. В. Беркало, О. В. Бобович, Н. О. Боброва та ін.; під ред. І. П. Кайдашева. – Полтава : Полімет, 2003. – 320 с.
12. Трухачева, Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н. В. Трухачева. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – 379 с.

REFERENCES

1. World Health Organization. Mortality Database. [n.d.]. Available at: http://www.who.int/healthinfo/mortality_data/en/index.html
2. Rothwell, J. A., Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Medina-Reimon, A., M'Hiri, N., Garcia-Lobato, P., ... Scalbert, A. (2013). Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*, 2013. <https://doi.org/10.1093/database/bat070>
3. Altaş, M., Var, A., Köse, C., Özbilgin, K., Arı1, Z. (2010). Endothelial dysfunction in high fructose containing diet fed rats: increased nitric oxide and decreased endothelin-1 levels in liver. *Dicle University Med School*, 37 (3), 193–198.
4. Reznikov, O. H. (2003). *Endokrynolohiia*, 8 (1), 142–145.
5. Andreieva, L. V., Verbytskyi, N. I., Vishchur, O. I., Vlizlo, V. V., Vovk, S. Y. (2004). *Fiziolo-ho-biokhimichni metody doslidzhen u biologii, tvarynyntstvi ta veterinaryarnii medytsyni: dovidnyk*. Lviv, 399.
6. Stalnaia, I. D., Garishvili, T. G. (1977). *Metod opredelenia malonovoho dyaaldehyda s pomoshchiiu tyobarbuturovoi kysloty. Sovremennye metody v biokhimii*. Moscow: Meditsina, 66 – 68.
7. Volchegorskii, I. F., Nalimov, A. G., Iarovinskii, B. G., Lifshic, R. I. (1989). *Voprosy meditsinskoj khimii*, 1, 127–131.
8. Speake, B. K., Surai, P. F., Noble, R. C. (1999). Comparative biochemistry and physiology. *Pt. B124*, 101–107.
9. Prokhorova, M. I. (ed). (1982). *Metody biokhimicheskikh issledovani (lipidnyi i energeticheskii obmen)*. St. Petersburg, 183–186.
10. Koroliuk, M. A., Ivanova, L. I., Maiorova, I. G. (1988). *Laboratornoe delo*, 1, 16–19.
11. Berkalo, L. V., Bobovych, O. V., Bobrova, N. O. (2003). *Metody klinichnykh ta eksperymentalnykh doslidzhen v medytsyni*. Poltava: Polimet, 320.
12. Trukhacheva, N. V. (2012). *Matematicheskaja statistika v mediko-biologicheskikh issledovaniakh s primeneniem paketa Statistica*. Moscow: GEO-TAR-Media, 379.

Відомості про авторів:

Стрельченко К. В., канд. біол. наук, доцент кафедри біологічної хімії, Національний фармацевтичний університет

Малоштан А. В., канд. біол. наук, асистент кафедри біологічної хімії, Національний фармацевтичний університет

Краснощок А. О., аспірант кафедри біологічної хімії, Національний фармацевтичний університет.

E-mail: KrasnoshchokAndrii@outlook.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4437-7593>

Information about authors:

Strelchenko K., Candidate (PhD) of Biological science, Associate Professor, associate professor of Department of the biological chemistry department. National University of Pharmacy

Maloshtan A., Candidate (PhD) of Biological science, Assistant of the Department of Biological Chemistry, National University of Pharmacy

Krasnoshchok A., post-graduate student of the Biological Chemistry department, National university of Pharmacy.

E-mail: KrasnoshchokAndrii@outlook.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4437-7593>

Сведения об авторах:

Стрельченко К. В., канд. биол. наук, доцент кафедры биологической химии, Национальный фармацевтический университет

Малоштан А. В., канд. биол. наук, ассистент кафедры биологической химии, Национальный фармацевтический университет

Краснощок А. А., аспирант кафедры биологической химии, Национальный фармацевтический университет.

E-mail: KrasnoshchokAndrii@outlook.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4437-7593>

Надійшла до редакції 20.11.2018 р.