

А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, О. А. Красільнікова,
Л. М. Вороніна, І. В. Сенюк
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

БІОДОСТУПНІСТЬ І АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ ПОЛІФЕНОЛІВ З НАСІННЯ ВИНОГРАДУ У ВІЛЬНОМУ ВИГЛЯДІ ТА У СКЛАДІ ФІТОСОМ

Кверцетин при пероральному введенні виявляють у максимальних концентраціях, головним чином, у крові, печінці та м'язах через 2 год. Введення кверцетину у вигляді фітосом призводить до значно більшого його накопичення у тканинах щурів. Поліфеноли винограду в складі фітосом також проявляють вищу антиоксидантну активність порівняно з поліфенольним концентратом у вільному вигляді.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: поліфеноли, фітосоми, біодоступність, антиоксидантна активність.

ВСТУП. Поліфеноли винограду культурно-го проявляють широкий спектр біологічних активностей. Найважливішими з них є протизапальний, антиканцерогенний, імуномодулюючий, пробіотичний, кардіопротекторний та антидіабетичний ефекти [8, 12]. В основі багатьох захисних впливів поліфенолів лежать їх антиоксидантні властивості, тобто їх здатність пригнічувати активацію вільнорадикальних процесів – неспецифічного чинника більшості патологій [2].

Разом із тим, серйозним недоліком даних речовин є їх низька біодоступність. Слабка розчинність як у воді, так і в ліпідах зумовлює низьку абсорбцію поліфенолів при пероральному введенні [5]. Крім того, молекули поліфенолів часто мають у своєму складі декілька ароматичних кілець, що також знижує ймовірність їх транспорту до клітин шляхом простої дифузії. Проблема низької біодоступності долається за допомогою комплексування рослинних поліфенолів з фосфоліпідами з утворенням ліпосом [1]. Нещодавно розроблено технологію комплексування біофлавоноїдів з фосфатидилхоліном з утворенням фітосом та показано більшу біодоступність і ефективність поліфенолів у їх складі [9].

Метою даної роботи було порівняльне дослідження біодоступності та антиоксидантної активності поліфенолів з насіння винограду у вільному вигляді та у складі фітосом на моделі оксидативного стресу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Роботу виконано на безпородних щурах-самцях масою

© А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, О. А. Красільнікова, Л. М. Вороніна, І. В. Сенюк, 2011.

180–220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Дослідження проводили відповідно до національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001).

Поліфенольний концентрат (ПФК) з насіння винограду білих сортів вводили щоденно протягом 15 діб внутрішньошлунково з розрахунку 9 мг на 100 г маси тіла у вільному вигляді або у складі фітосом.

Фітосоми отримували, як описано в роботі [1]. Екстракт з насіння винограду упарювали, подрібнювали у гомогенізаторі за присутності лецитину (співвідношення сухий екстракт:лецитин складало 1:1). До сухої суміші додавали дистильовану воду, суміш струшували на універсальному струшувачі WU-4. Отримані фітосоми висушували шляхом ліофілізації. Сухий порошок перерозчиняли у воді та вводили тваринам, як зазначено вище.

Біодоступність перорально введених поліфенолів оцінювали на прикладі вільного [¹⁴C]кверцетину та [¹⁴C]кверцетину в складі фітосом (53 мкКи/ммоль, ChemSyn Laboratories, USA). Мічений кверцетин вводили з розрахунку 9 мг на 100 г маси тіла у радіоактивній дозі 58,5×10⁶ dpm. Через 0,5, 1, 2, і 5 год тварин декапітували, відбирали аліквоти плазми крові та зразки тканин. Зразки тканин подрібнювали, радіоактивність визначали у сцинтиляційній рідині ЖС-8 за допомогою лічильника радіоактивності БЕТА. Надходження [¹⁴C]кверцетину також досліджували на ізольованих гепатоцитах щурів в умовах *in vitro*.

Антиоксидантну активність поліфенолів оцінювали за їх здатністю гальмувати активацію перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у

щурів за умов стресу. Оксидативний стрес викликали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення хлориду кобальту з розрахунку 3 мг на 100 г маси тіла [3]. Тварин декапітували під хлоразоло-уретановим наркозом через 1 год після ін'єкції. Інтактним тваринам вводили відповідний об'єм фізрозчину. Інтенсивність процесів ПОЛ визначали за вмістом ТБК-активних продуктів у крові та печінці спектрофотометрично, як описано в роботі [10].

Результати експериментів обробляли статистично, достовірність змін оцінювали за непараметричним U-критерієм Манна-Уїтні. Розходження вважали статистично значущими, якщо $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Розподіл міченого вільного [^{14}C]кверцетину в плазмі крові та тканинах тварин наведено в таблиці 1.

В дослідженні проміжки часу найбільшу радіоактивність (86–93 %) було виявлено у шлунково-кишковому тракті (ШКТ). в тому числі у вмісті шлунка, тонкої та товстої кишок. Через 30 хв 6,8 % мітки вже виявляли у крові, а також [^{14}C]кверцетин з'являвся в тканинах. Максимальне накопичення міченого [^{14}C]кверцетину в плазмі крові та тканинах спостерігали через 2 год після введення. Отримані нами дані узгоджуються з даними літератури про те, що пік концентрації кверцетину та його глікозилізованих похідних припадає на цей проміжок часу [7]. Абсорбований мічений кверцетин після всмоктування потрапляє у кров та перерозподіляється по клітинах органів і тканин.

Максимальна радіоактивність мала місце в печінці, серці, м'язовій тканині та нирках. Згідно з даними, отриманими в цій роботі, слідову кількість [^{14}C]кверцетину було виявлено в легенях та селезінці. В мозку радіоактивність практично не спостерігалася, що може бути пов'язано з досить великими розмірами молекули кверцетину, яка не проникає через

гематоенцефалічний бар'єр. Через 5 год після введення вміст міченого кверцетину як у плазмі крові, так і в тканинах суттєво знижувався, що зумовлено швидким метаболізмом біофлавоноїдів в організмі [4].

Динаміка радіоактивності у плазмі для кверцетину в складі фітосом подібна для міченого вільного кверцетину (рис. 1). Максимальна радіоактивність спостерігалася через 2 год, а через 5 год після введення вона значно знижувалась, що, очевидно, пов'язано з надходженням кверцетину до клітин тканин та органів, а також з виведенням його з організму. Проте слід відзначити, що у тварин, яким вводили фітосоми з [^{14}C]кверцетином, накопичення міченого кверцетину в плазмі відбувалося більш інтенсивно та перевищувало в 1,35 раза (через 1 год), 1,85 раза (через 2 год), 1,62 раза (через 3 год) аналогічний показник у щурів, яким вводили вільний [^{14}C]кверцетин.

Цікаві дані отримані нами при порівнянні біодоступності кверцетину на ізольованих гепатоцитах щурів в умовах *in vitro*. Встановлено, що при інкубації клітин з вільним [^{14}C]кверцетином найбільш інтенсивне його надходження до клітин відбувалося протягом перших 30 хв експерименту (рис. 2). В подальшому швидкість надходження міченої сполуки до клітин стабілізувалася, що знайшло відображення на кривій у вигляді "плато".

Динаміка надходження [^{14}C]кверцетину в складі фітосом суттєво відрізняється. Протягом 50 хв експерименту відбувалося постійне збільшення надходження міченого кверцетину до клітин і на 50 хвилині експерименту в 2,59 раза перевищувало цей показник при інкубації клітин з вільним [^{14}C]кверцетином.

Отримані нами результати свідчать про те, що флавоноїди у складі фітосом мають більшу біодоступність як в умовах *in vivo*, так і в умовах *in vitro*. Останнє можна пояснити утворенням молекулярного комплексу лецитину та

Таблиця 1 – Розподіл радіоактивності в органах і тканинах щурів після введення вільного [^{14}C]кверцетину (імп/хв/мг білка, $M \pm m$, $n=6$)

Тканина	Час після введення кверцетину, год			
	0,5	1	2	5
ШКТ	50 303±4460	54 530±4728	51 494±8091	53 870±789
Плазма крові	1460±35	1644±401	1696±157	982±149
Еритроцити	7±2	4±4	5±2	5±2
Печінка	304±78	684±240	1127±623	155±22
Серце	154±79	291±110	315±124	123±170
М'язова тканина	471±76	753±289	839±310	130±51
Легені	25±3	38±10	27±7	14±3
Мозок	0±0	1±1	1±2	1±2
Селезінка	5±1	6±1	5±1	18±30
Нирки	104±12	468±295	595±346	163±85

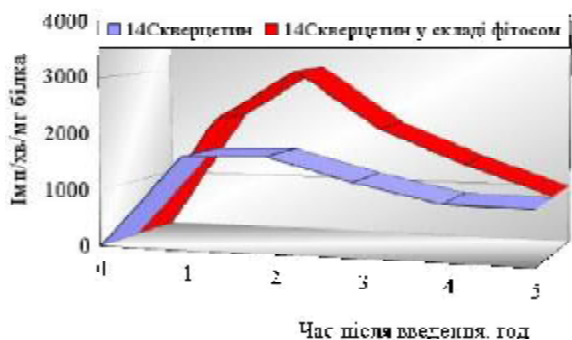


Рис. 1. Радіоактивність плазми крові щурів після введення $[^{14}\text{C}]$ кверцетину та $[^{14}\text{C}]$ кверцетину у складі фітосом (імп/хв/мг білка).

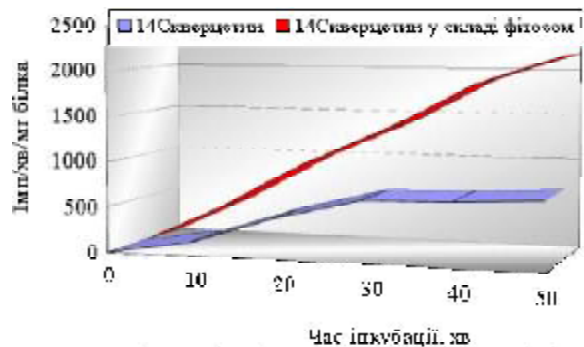


Рис. 2. Радіоактивність ізольованих гепатоцитів щурів після інкубації $[^{14}\text{C}]$ кверцетину та $[^{14}\text{C}]$ кверцетину у складі фітосом (імп/хв/мг білка).

кверцетину з квазістабільним зв'язком. Даний комплекс проявляє значно більшу амфіфільність, що дозволяє йому легко проникати через ліпідний бішар мембрани клітин (у наших дослідженнях ентероцити, гепатоцити), а також вільно транспортуватися в цитозолі [9].

Дані про антиоксидантну активність поліфенолів винограду за умов оксидативного стресу наведено в таблиці 2. Введення тваринам хлориду кобальту спричиняло накопичення ТБК-реактивних продуктів як у печінці, так і в крові щурів, що свідчить про активацію процесів ПОЛ.

Поліфеноли винограду знижували рівень ТБК-реактивних продуктів у досліджених тканинах, що підтверджувало їх антиоксидантні властивості. Слід відзначити, що поліфеноли у складі фітосом проявляли більш виражену антиоксидантну активність порівняно з поліфе-

нольними концентратами: 21 % (концентрат) і 37 % (фітосоми) у сироватці крові та 22 % (концентрат) і 32 % (фітосоми) у печінці (табл. 2).

Цікаво, що досліджені поліфеноли у складі фітосом проявляли вищу активність за умов оксидативного стресу порівняно з фітосомами Leucoselect (дані літератури). Це може бути пов'язано зі складом поліфенолів у фітосомах. Так, фітосоми з поліфенолами винограду, отримані G. B. Vigna et al. [6] на основі стандартизованого поліфенольного екстракту Leucoselect, містять понад 95 % катехіну, епікатехіну, їх галатів і близько 5 % олігомерних проціанідинів (пентамерів, гексамерів, гептамерів тощо). Досліджені фітосоми, крім цих сполук, містять також групу антоціанів, кверцетин і його глікозид та інші поліфеноли, які можуть значно збільшувати антиоксидантну активність фосфоліпід-поліфенольних комплексів [11].

Таблиця 2 – Вплив поліфенольного концентрату з насіння винограду білих сортів у вільному вигляді та у складі фітосом на вміст ТБК-реактивних продуктів у сироватці крові та печінці щурів при введенні хлориду кобальту (мкмоль/мг білка, $M \pm m$, $n=6$)

Тканина	Вид впливу			
	Інтакт	CoCl_2	ПФК+ CoCl_2	Фітосоми+ CoCl_2
Сироватка крові	16,54±7,67	67,95±3,49*	58,33±2,99**	47,26±5,87***
Печінка	76,48±2,12	93,97±7,45*	79,31±5,78**	73,67±7,89***

Примітка. * – різниця достовірна між групами інтакт– CoCl_2 ; ** – різниця достовірна між групами CoCl_2 –ПФК+ CoCl_2 ; *** – різниця достовірна між групами ПФК+ CoCl_2 –фітосоми+ CoCl_2 .

ВИСНОВКИ. Максимальне накопичення ^{14}C -міченого кверцетину відбувається через 2 год після введення, головним чином, у плазмі крові, печінці, серці, м'язовій тканині та

нирках. Поліфеноли з насіння винограду білих сортів у складі фітосом проявляють більшу біодоступність та забезпечують ефективніший антиоксидантний захист порівняно з поліфенолами у вільному вигляді.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Краснопольский Ю. М. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов в условиях ПГМР / Ю. М. Краснопольский, А. Е. Степа-

нов, В. И. Швец // Биофармац. журн. – 2009. – 1, № 3. – С. 18–29.

2. Окислительный стресс. Прооксиданты и анти-

оксиданты / [Е. Б. Меньшикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др.]. – М. : Фирма "Слово", 2006. – 556 с.

3. Содержание и состав липопротеинов крови и печени крыс и некоторые показатели окислительного стресса при введении хлорида кобальта / П. А. Калиман, Р. В. Шаламов, А. Л. Загайко [и др.] // Укр. биохим. журн. – 1997. – **69**, № 5. – С. 138–148.

4. Bischoff S. C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease / S. C. Bischoff // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2008. – **11**, № 6. – P. 733–740.

5. Del Rio D. Berry flavonoids and phenolics: bioavailability and evidence of protective effects / D. Del Rio, G. Borges, A. Crozier // Br. J. Nutr. – 2010. – **104**, № 3. – P. 67–90.

6. Effect of a standardized grape seed extract on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in heavy smokers / G. B. Vigna, F. Costantini, G. Aldini [et al.] // Metabolism. – 2003. – **52**, № 10. – P. 1250–1252.

7. Enzymatically modified isoquercitrin, alpha-oligoglucosyl quercetin 3-O-glucoside, is absorbed more easily than other quercetin glycosides or aglycone after oral administration in rats / T. Makino, R. Shimizu,

M. Kanemaru [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2009. – **32**, № 12. – P. 2034–2040.

8. Gollucke A. P. Recent applications of grape polyphenols in foods, beverages and supplements / A. P. Gollucke // Recent. Pat. Food. Nutr. Agric. – 2010. – **2**, № 2. – P. 105–109.

9. Kidd P. M. Bioavailability and activity of phyto-some complexes from botanical polyphenols: the silymarin, curcumin, green tea, and grape seed extracts / P. M. Kidd // Altern. Med. Rev. – 2009. – **14**, № 3. – P. 226–246.

10. Levels of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde are increased in brain of human chronic users of methamphetamine / P. S. Fitzmaurice, J. Tong, M. Yazdanpanah [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2006. – **319**, № 2. – P. 703–709.

11. The inactivation of lipid peroxide radical by quercetin. A theoretical insight / S. G. Chiodo, M. Leopoldini, N. Russo, M. Toscano / Phys. Chem. Chem. Phys. – 2010. – **12**, № 27. – P. 7662–7670.

12. Verma A. K. The biological potential of flavones / A. K. Verma, R. Pratap // Nat. Prod. Rep. – 2010. – **27**, № 11. – P. 1571–1593.

А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, О. А. Красильникова, Л. Н. Воронина, И. В. Сеник
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

БИОДОСТУПНОСТЬ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИФЕНОЛОВ ИЗ СЕМЯН ВИНОГРАДА В СВОБОДНОМ ВИДЕ И В СОСТАВЕ ФИТОСОМ

Резюме

Кверцетин при пероральном введении обнаруживают в максимальных концентрациях, главным образом, в крови, печени и мышцах через 2 часа. Введение кверцетина в виде фитосом ведёт к значительно большему его накоплению в тканях крыс. Полифенолы винограда в составе фитосом также обладают более высокой антиоксидантной активностью по сравнению с полифенольным концентратом в свободном виде.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полифенолы, фитосомы, биодоступность, антиоксидантная активность.

A. L. Zahayko, V. P. Fylymonenko, O. A. Krasilnikova, L. M. Voronina, I. V. Senyuk
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

BIOAVAILABILITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYPHENOLS FROM GRAPE'S SEEDS IN FREE KIND AND IN PHYTOSOMES

Summary

The grape polyphenol (quercetin) under oral administration is exposed in highest concentrations mainly in blood, liver and muscles in 2 hours. The quercetin administration in phytosomes causes larger its accumulation in rat tissues. Grape seeds polyphenols in phytosomes manifest the higher antioxidant activity than polyphenolic concentrate in free kind.

KEY WORDS: polyphenols, phytosomes, bioavailability, antioxidant activity.

Отримано 25.05.11

Адреса для листування: А. Л. Загайко, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.