

**Исследование антиоксидантной активности
фитопрепарата «Тигровый глаз - орто»**

Лункин В.В., Поляшова Т.И.

НПФ «МЕДИКОМЕД»

Действие активных форм кислорода (АФК) на клетки и ткани

Воздействие активных форм кислорода в высоких концентрациях на клетки и ткани приводит к их повреждению и гибели, что является причиной многих заболеваний.



**Активные формы кислорода
и болезни**

Генетические аномалии
ведут к
недостаточности
компонентов
NADPH оксидазы (CGD)

Аллергии и аутоиммунные
заболевания

Опухоли и рак

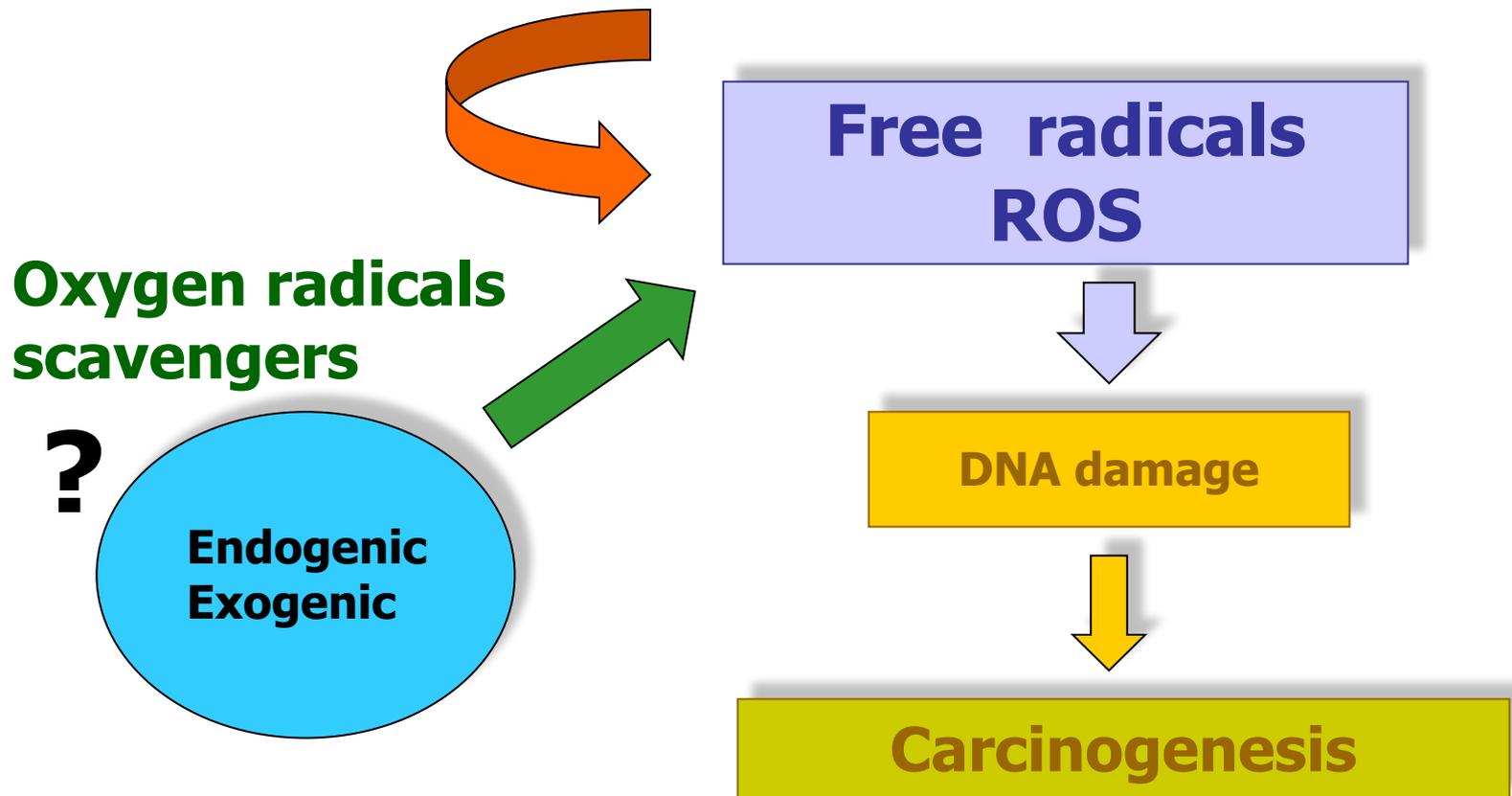
Соматические
заболевания
(сахарный диабет)

Дисфункция адгезии
фагоцитов,
ослабление или отсутствие
респираторного взрыва,
секреторной дегрануляции,
апоптоза

Дисфункция
нейтрофилов

DANGER

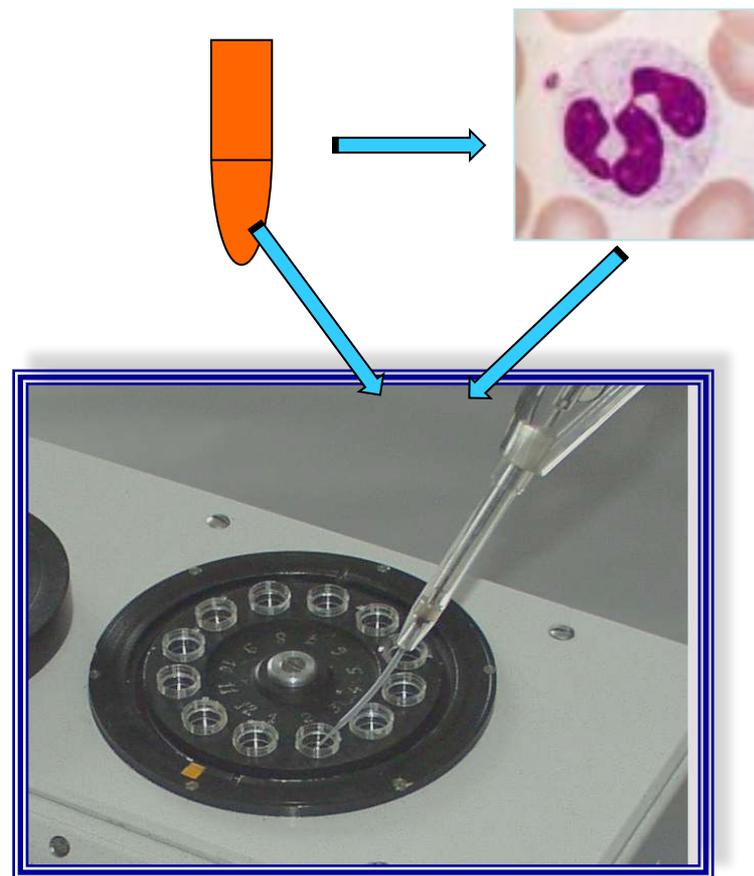
**Chemicals
Radiation
Microbial and virus infection**



- *Предпосылки работы.* Природные соединения и их композиции являются потенциальными экзогенными «ловушками» АФК и других свободных радикалов и требуют научного анализа для их практического применения.
- *Задача работы* состояла в исследовании антиоксидантной активности препарата *«Тигровый глаз – орто»* на экспериментальных моделях *in vitro*: нефракционированной крови человека, изолированных гранулоцитах крови человека, ферментативной бесклеточной среде.

Объект и Метод

Работа проведена на клетках периферической нефракционированной крови, изолированных гранулоцитах человека и на модели ферментативной реакции

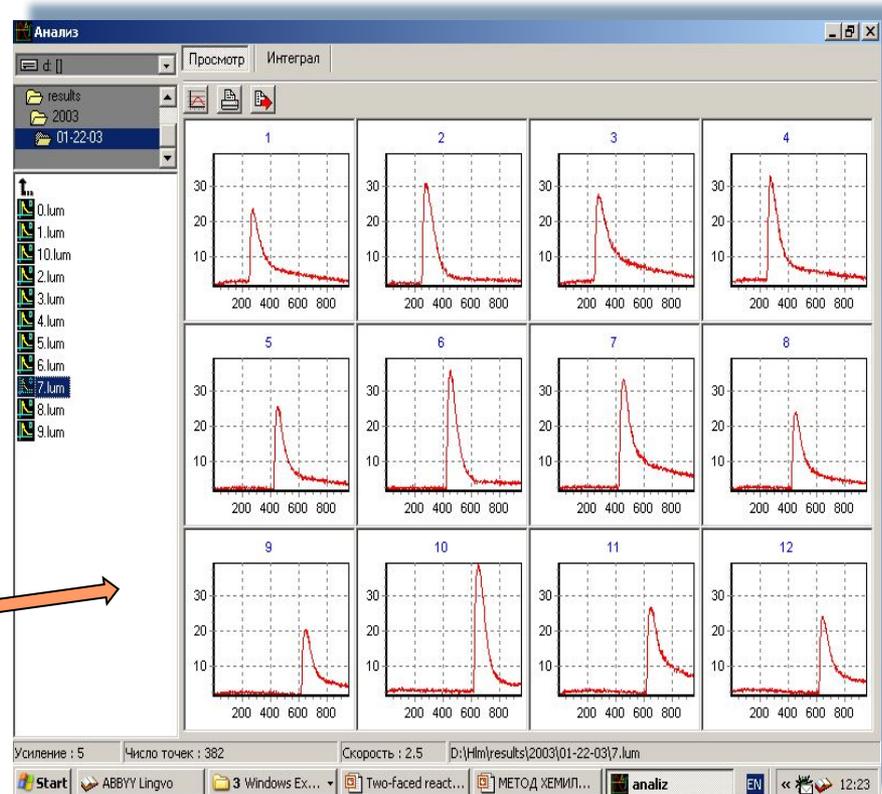
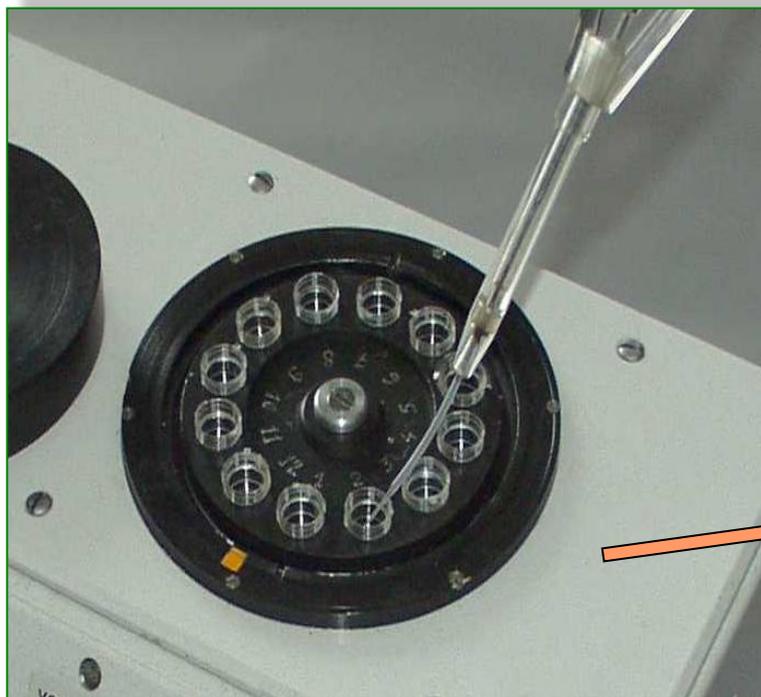


Интенсивность генерации АФК была оценена по люминол-зависимой хемилюминесценции с использованием хемилюминометра ХЕМИЛЮМ-12, который позволяет проводить измерения одновременно в 12 образцах.

Прибор разработан в Лаборатории клеточной нейробиологии Института биофизики клетки РАН.

ХЕМИЛЮМ-12

Хемилюминометр роторный 12-ячеечный

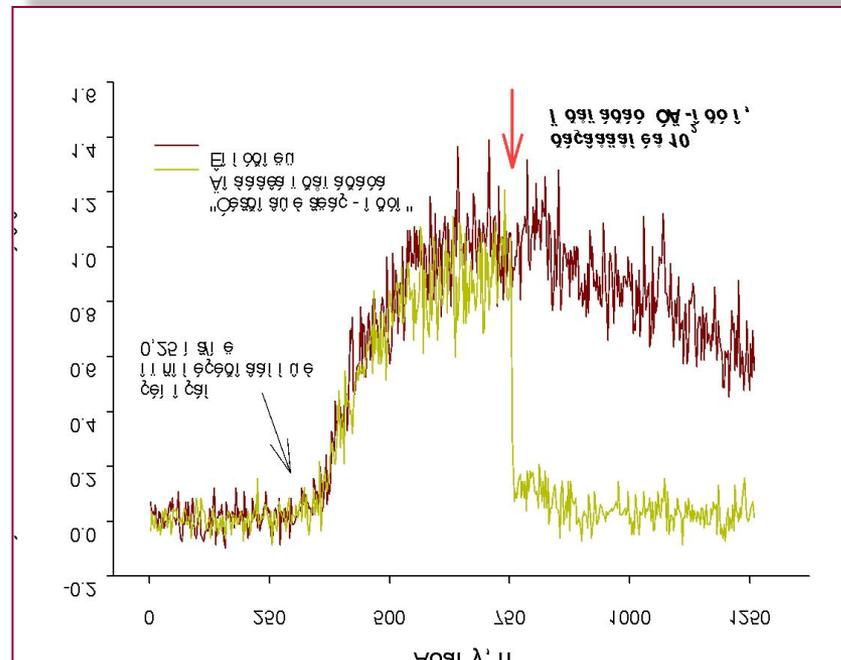
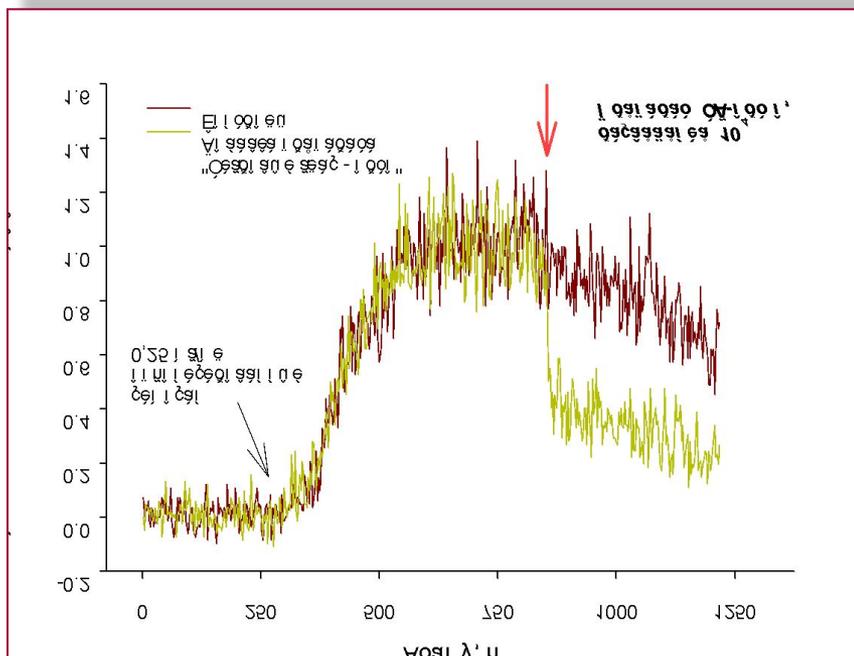


ХЕМИЛЮМ-12 работает с пробами объемом от 0,1 до 0,3 мл, помещаемыми одновременно в 12 ячеек. В процессе регистрации на экране монитора выстраиваются 12 графиков; через каждые 2,5 секунды на каждом из них ставится очередная точка.

Одновременная регистрация хемилюминесценции от 12 проб позволяет получить серию измерений с использованием минимального количества исследуемого материала.

Высокая чувствительность при стабильном уровне нуля, возможность регистрировать быстрые изменения хемилюминесценции, - все это при большом числе одновременно анализируемых проб малого объема - главные отличительные черты прибора.

Проявление антиоксидантных свойств препарата «ТИГРОВЫЙ ГЛАЗ – орто» в цельной крови человека



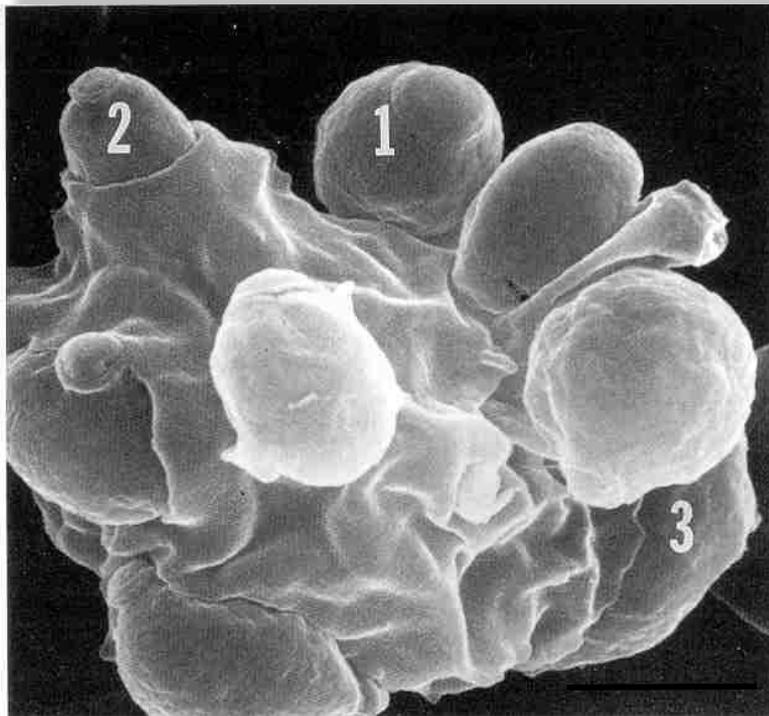
Препарат «ТИГРОВЫЙ ГЛАЗ - орто»

дозозависимо понижал уровень продукции активных форм кислорода (АФК) в цельной крови человека. Высокий уровень АФК в крови является опасным и высокореактивным повреждающим фактором для клеток и тканей организма.

Нейтрофил - полиморфноядерный нейтрофильный гранулоцит



5 мкм



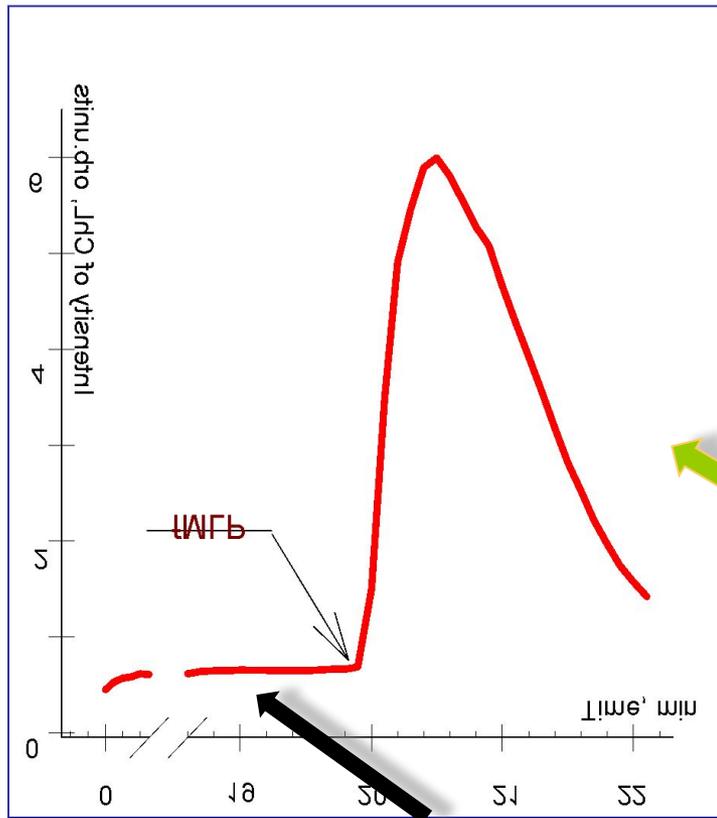
- Фагоцитоз
- Дегрануляция
- Респираторный взрыв

Фагоцитоз зимозана нейтрофилом

(с любезного разрешения
Dr. K.B.Pryzwansky)

- 1 – прикрепление частицы зимозана;
- 2 – образование псевдоподии вокруг зимозана;
- 3 - поглощение

Респираторный взрыв

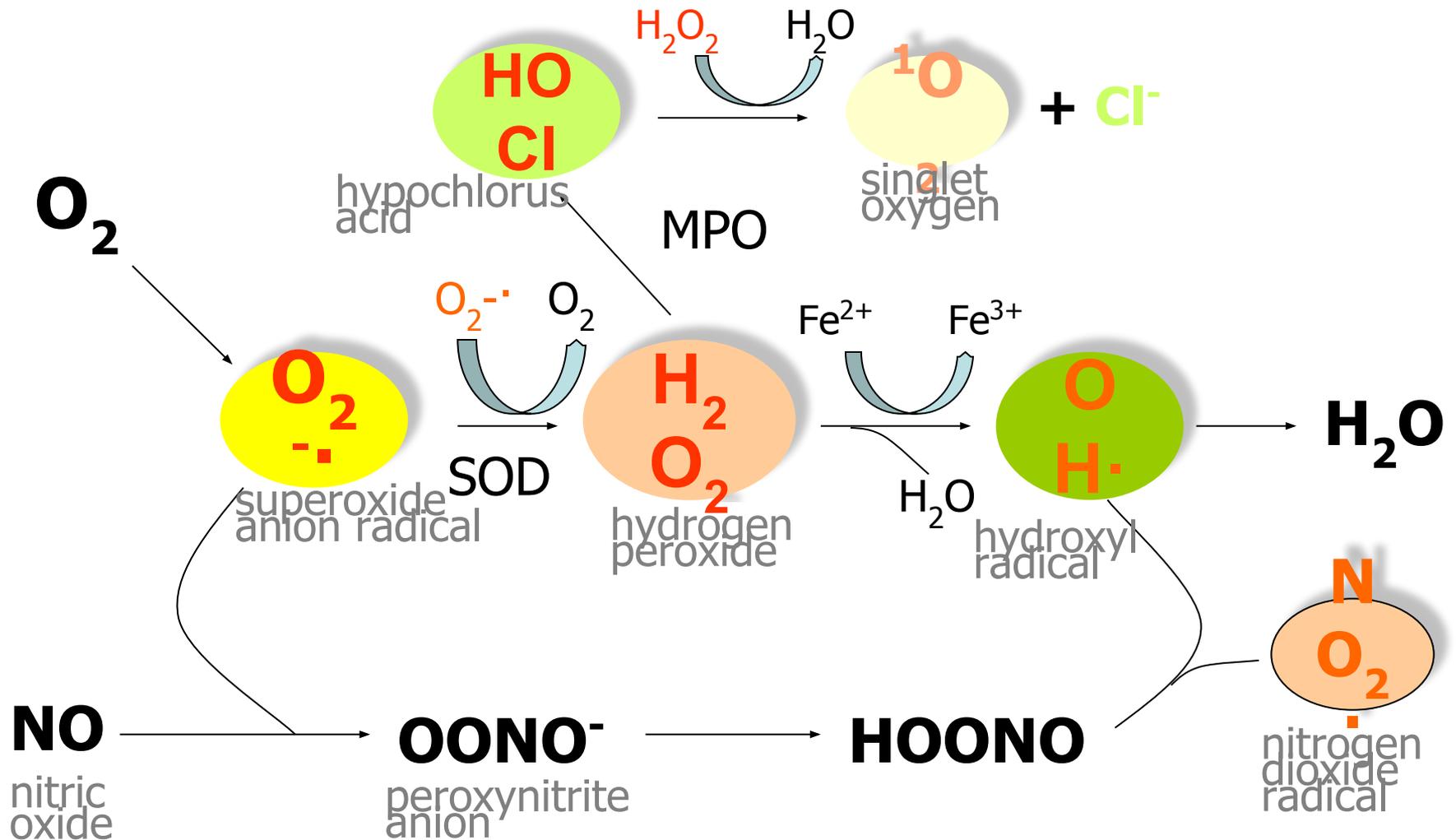


- Повышенная утилизация глюкозы
- Усиленное потребление O_2
- Активация гексозомонофосфатного пути
- Усиленная продукция активных форм кислорода

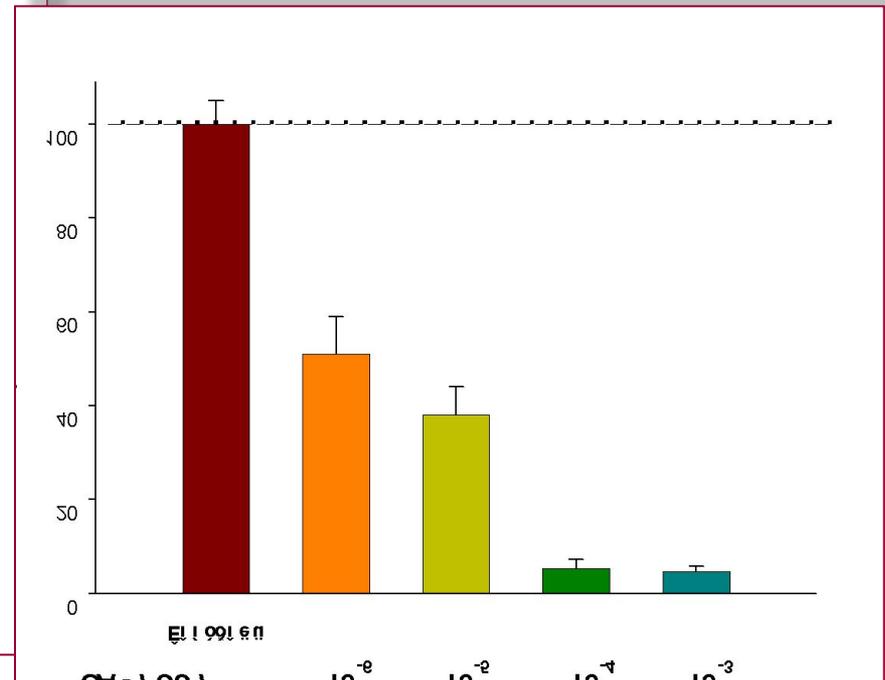
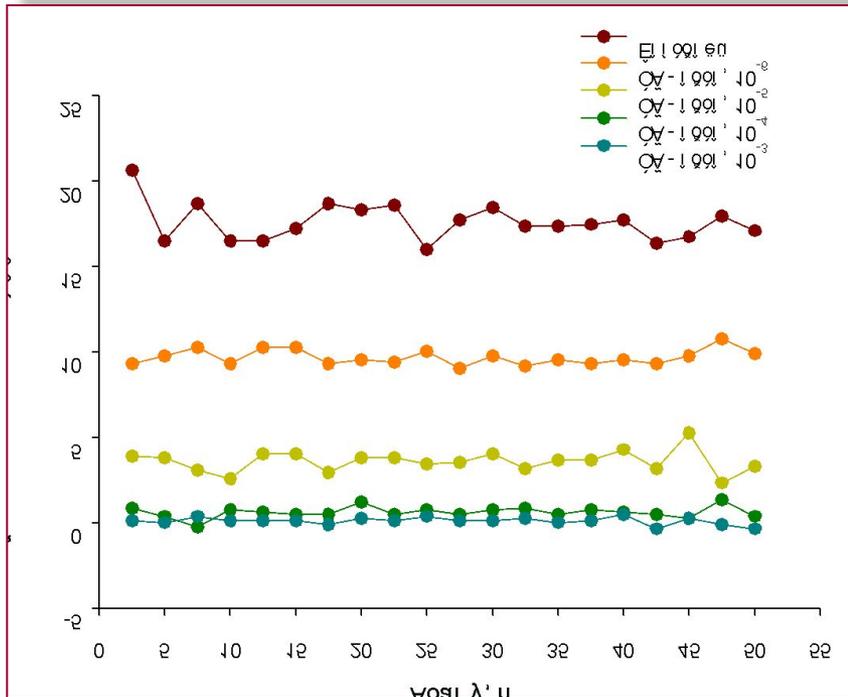
Активированная продукция АФК
 $0,5-1 \text{ nmol/мин/}10^6 \text{ клеток}$

Спонтанный уровень продукции АФК

Реактивные формы кислорода



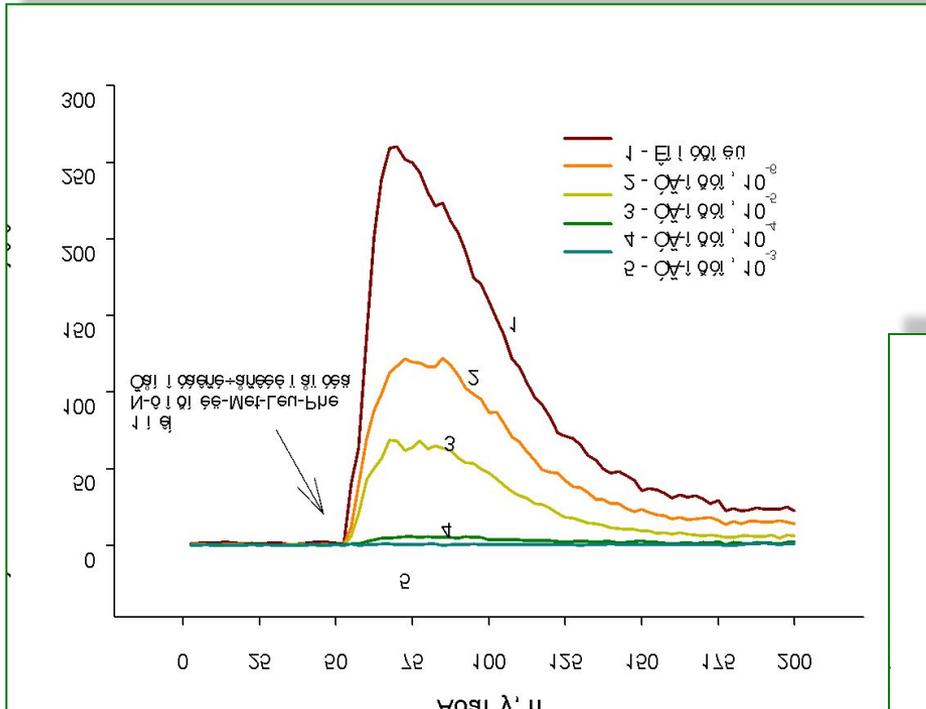
Антиоксидантные свойства препарата «ТИГРОВЫЙ ГЛАЗ – орто»



Клетки были инкубированы с *ТГ-орто* в
возрастающих концентрациях
в течение 30 мин при 37°C

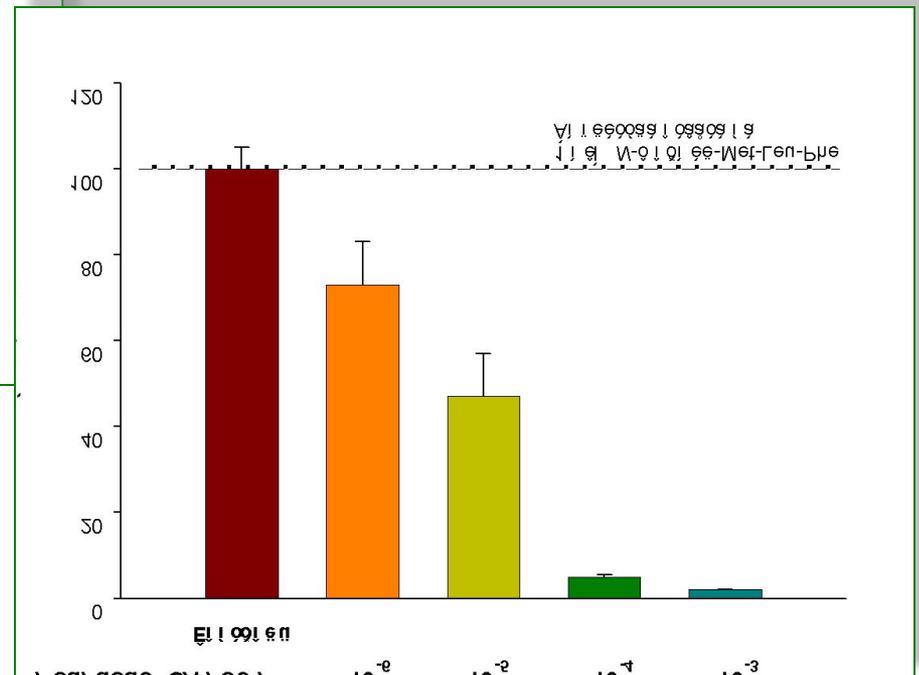
Препарат «ТИГРОВЫЙ ГЛАЗ – орто»
дозозависимо понижает высокий уровень спонтанной
продукции АФК изолированными нейтрофилами человека

Влияние препарата «ТИГРОВЫЙ ГЛАЗ – орто» на опосредованную рецептором хемотаксического пептида продукцию АФК изолированными гранулоцитами крови человека



Препарат ТГ-орто

дозозависимо подавляет развитие респираторного взрыва в изолированных гранулоцитах.

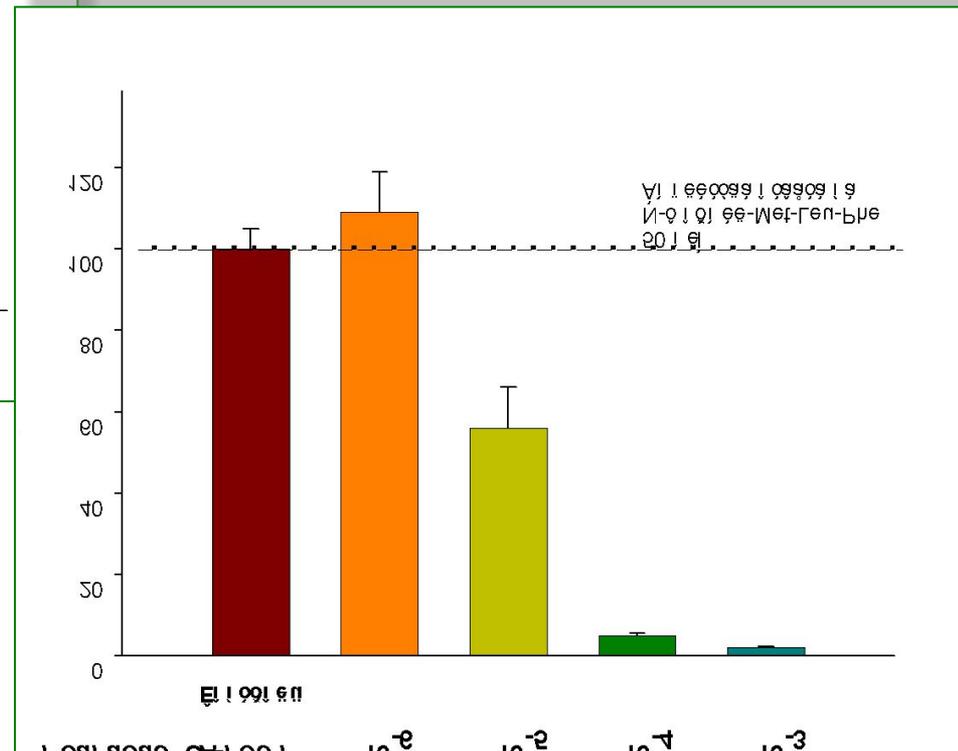
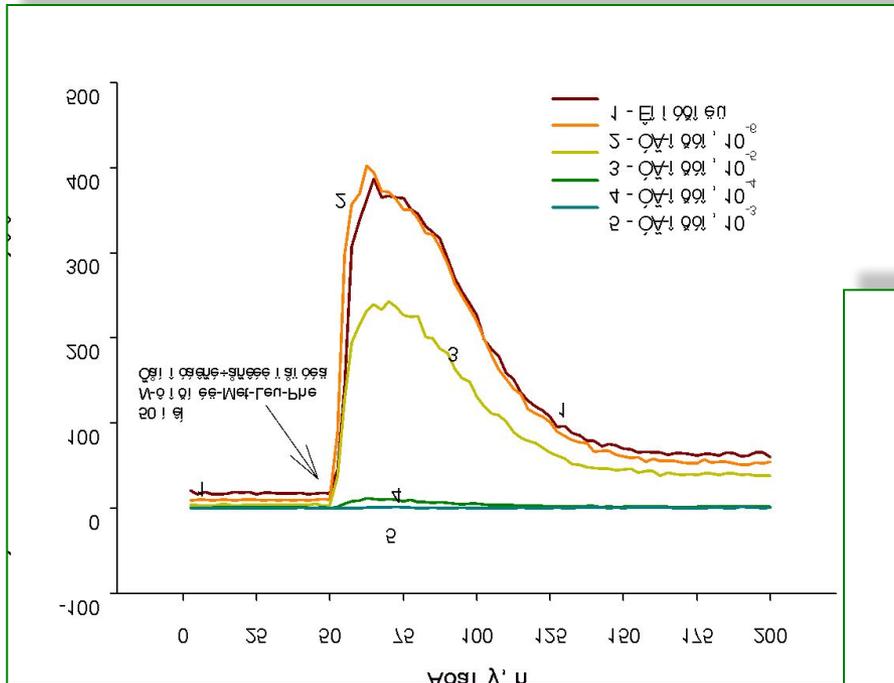


Клетки были инкубированы с **ТГ-орто** в различных разведениях при 37°C в течение 30 мин, затем активированы 1 мкМ N-формил-Met-Leu-Phe, чтобы вызвать респираторный взрыв.

Влияние препарата «ТИГРОВЫЙ ГЛАЗ – орто» на опосредованную рецептором хемотаксического пептида продукцию АФК изолированными гранулоцитами крови человека

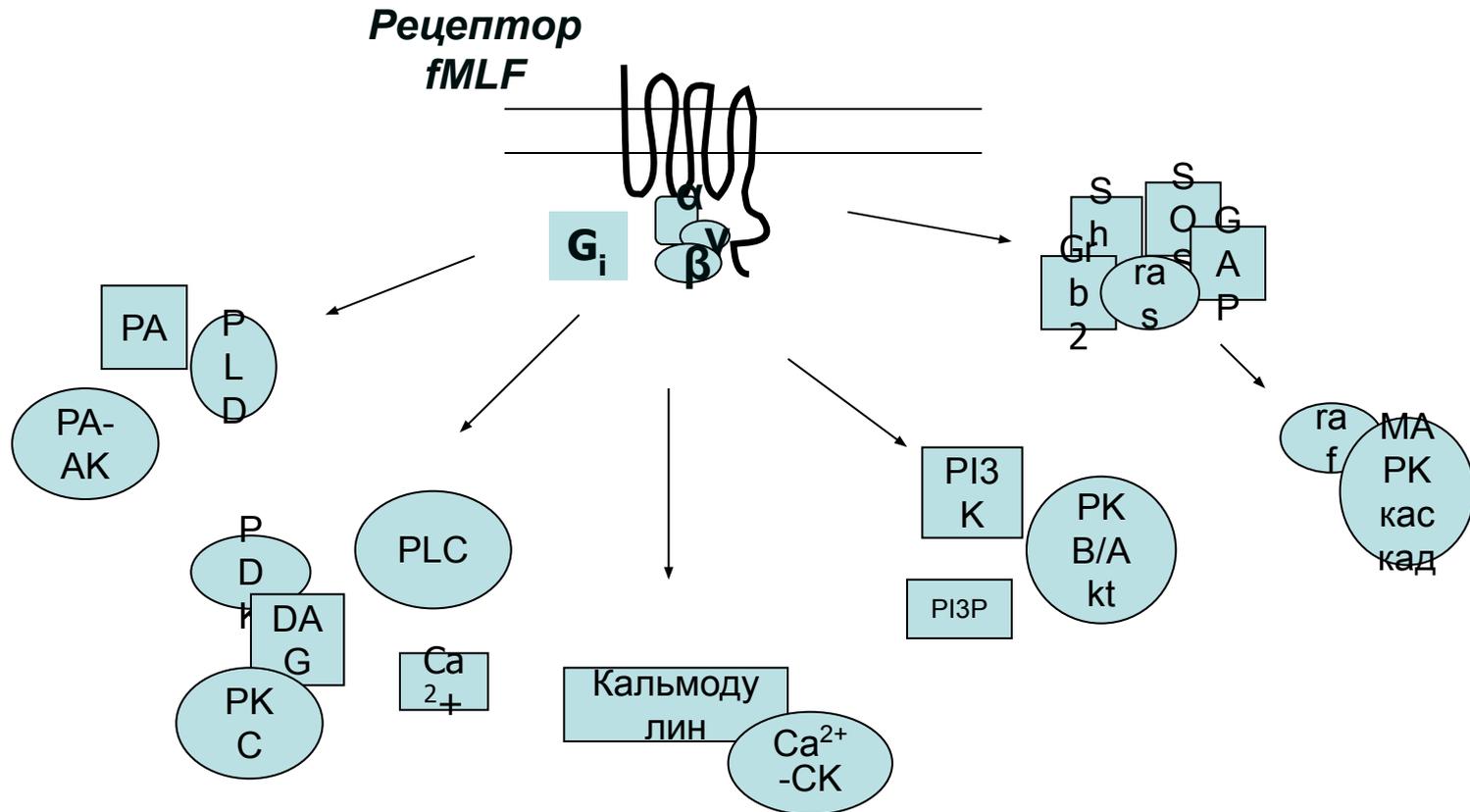
Препарат ТГ-орто

дозозависимо изменяет способность
гранулоцитов продуцировать активные
формы кислорода

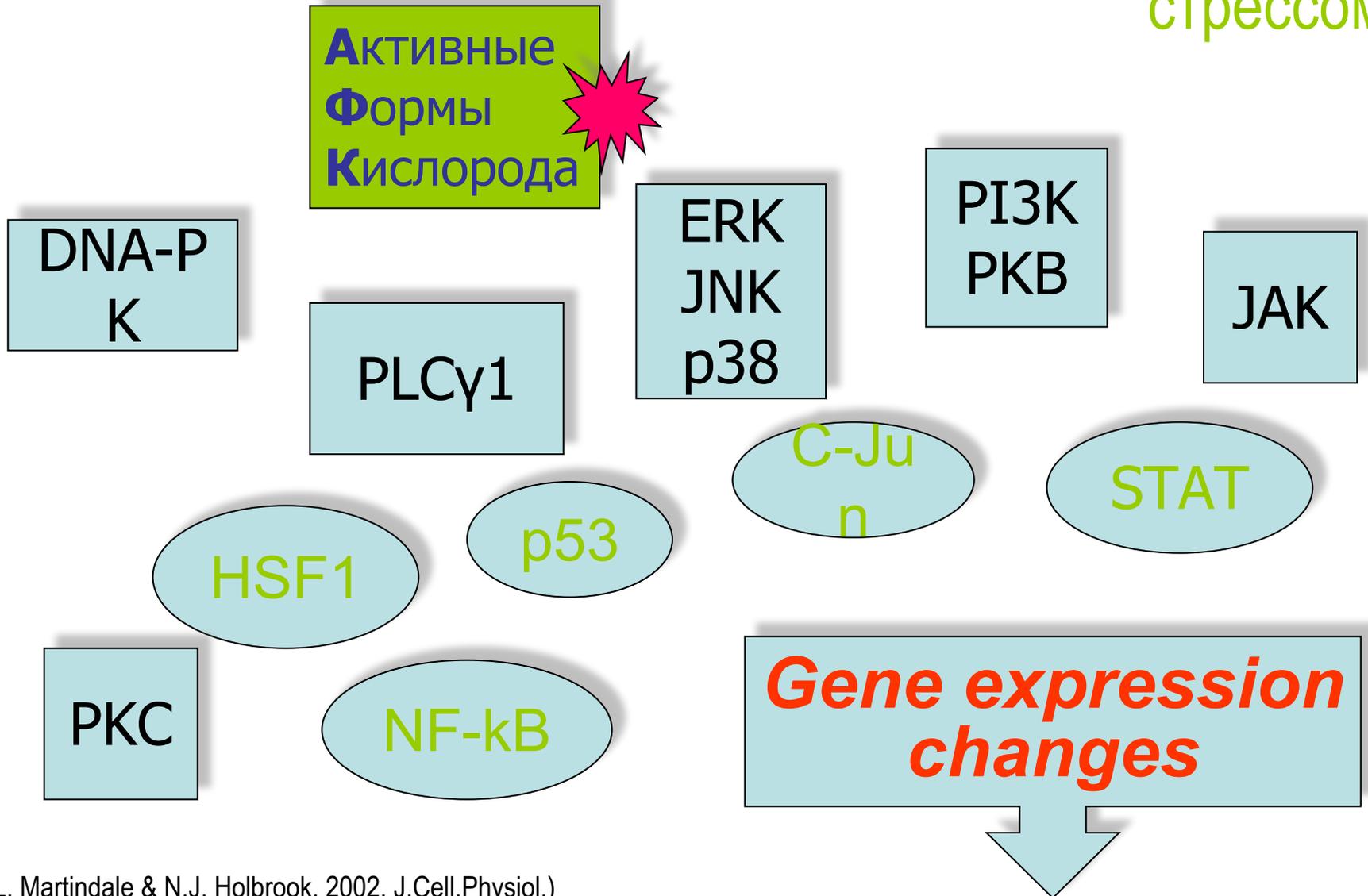


Клетки были инкубированы с
ТГ-орто в различных разведениях
при 37°C в течение 30 мин,
затем активированы 50 мкМ N-формил-Met-Leu-Phe,
чтобы вызвать респираторный взрыв.

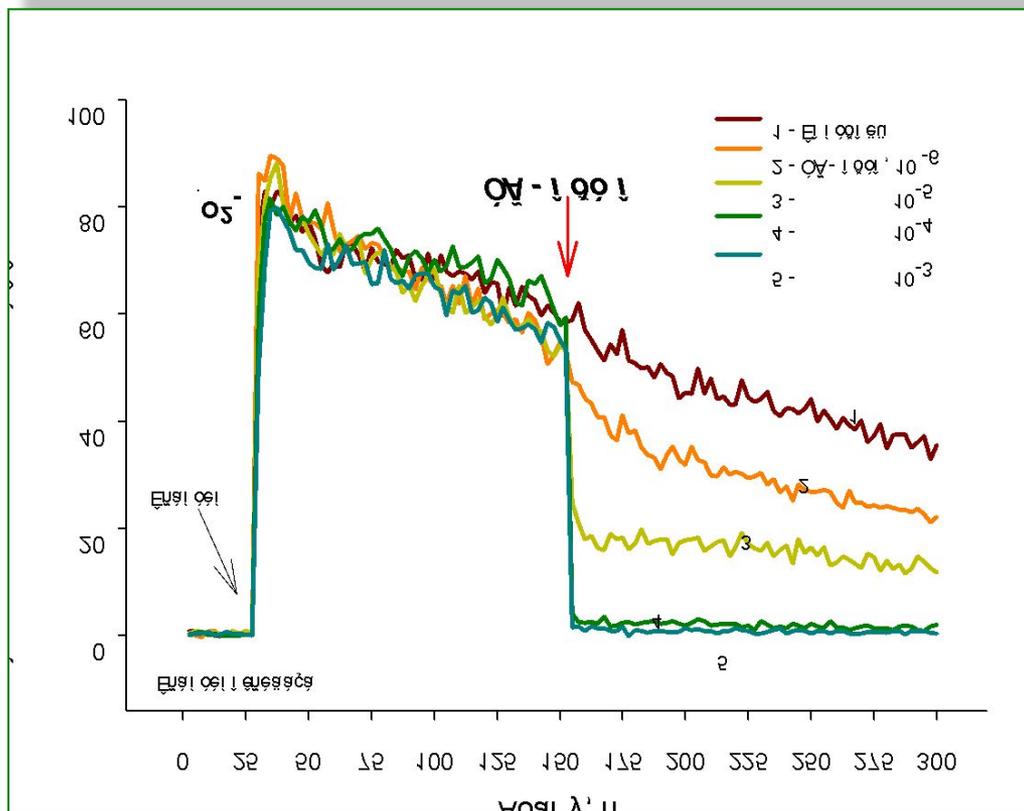
Участники передачи сигнала от рецептора fMLF



Сигнальные пути, активируемые окислительным стрессом

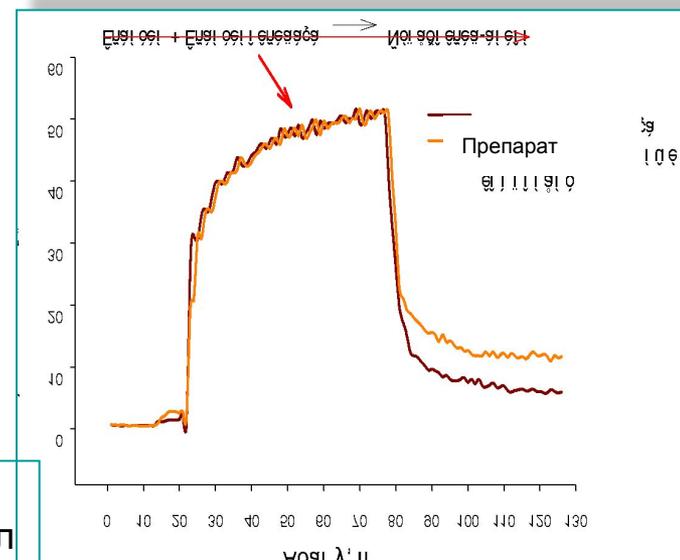


Оценка антиоксидантной активности препарата «ТИГРОВЫЙ ГЛАЗ - орто» на модели супероксид-анион продуцирующей ферментативной реакции



Препарат «ТИГРОВЫЙ ГЛАЗ - орто»

дозозависимо ингибирует генерацию АФК в ферментативной бесклеточной реакции «ксантин – ксантинооксидаза».



В реакции «ксантин – ксантинооксидаза» продуцируется супероксид-анион радикал

Выводы:

- Антиоксидантная активность препарата «ТИГРОВЫЙ ГЛАЗ – орто» проявляется в цельной крови, на изолированных клетках и в ферментативной реакции.
- Препарат «ТИГРОВЫЙ ГЛАЗ – орто» обладает высокой антиоксидантной активностью в дозах, достигаемых при его разведении более чем в 100000 раз.
- Антиоксидантное действие исследуемого препарата направлено на супероксид-анион радикал, который является исходной формой активных интермедиатов кислорода.

Предполагается, что применение препарата может быть полезным при заболеваниях, сопровождающихся дисфункцией фагоцитов, связанной с избыточной нерегулируемой продукцией АФК.

Работа выполнена совместно с сотрудниками
Лаборатории клеточной нейробиологии
Института Биофизики клетки
Российской Академии Наук
г. Пущино

Благодарности

***Сафронова В.Г.
Мальцева В.Н.
Кротова Л.М.
Санталов Б.Ф.***