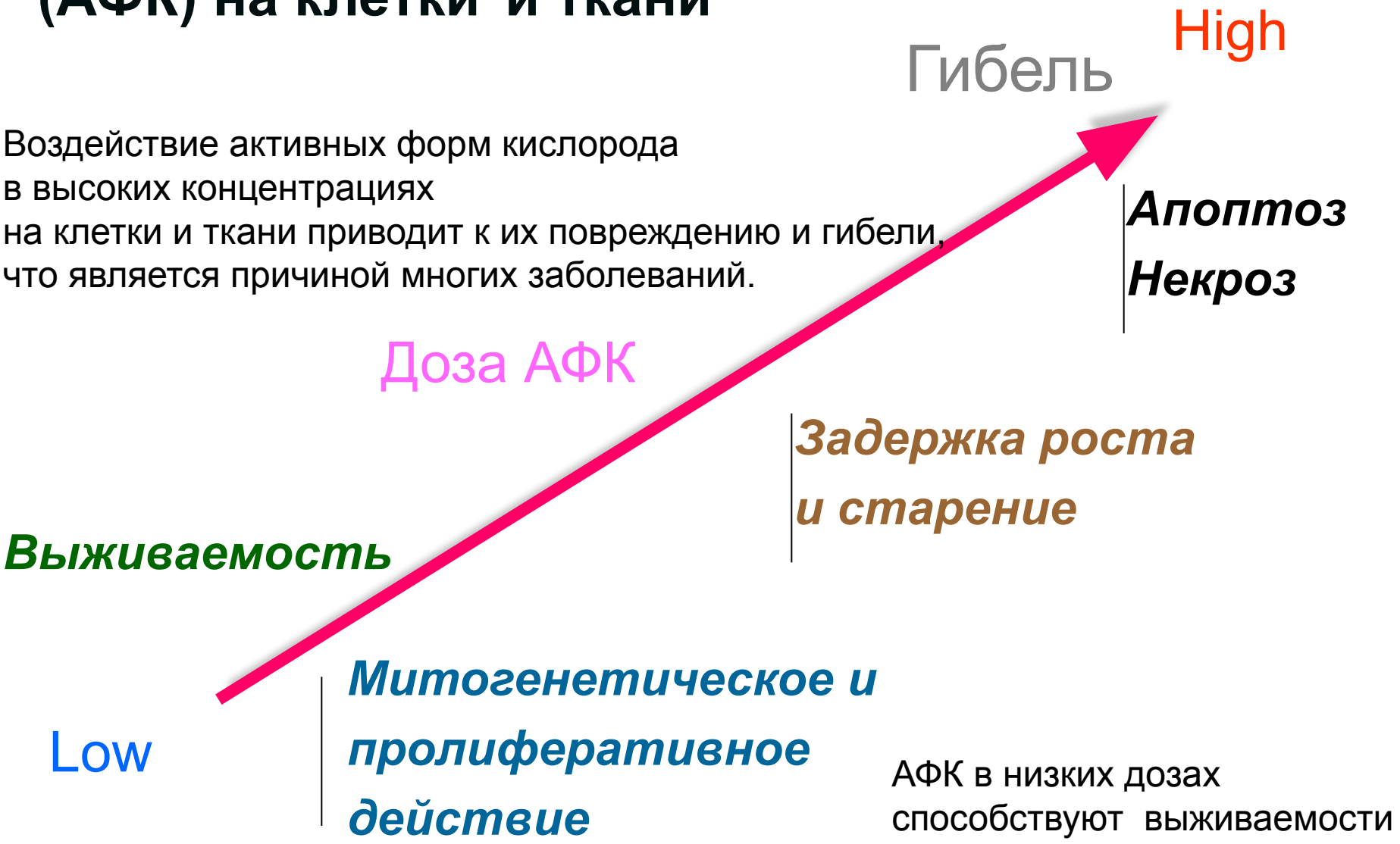
Исследование антиоксидантной активности фитопрепарата *«Тигровый глаз - орто»*

Лункин В.В., Поляшова Т.И.

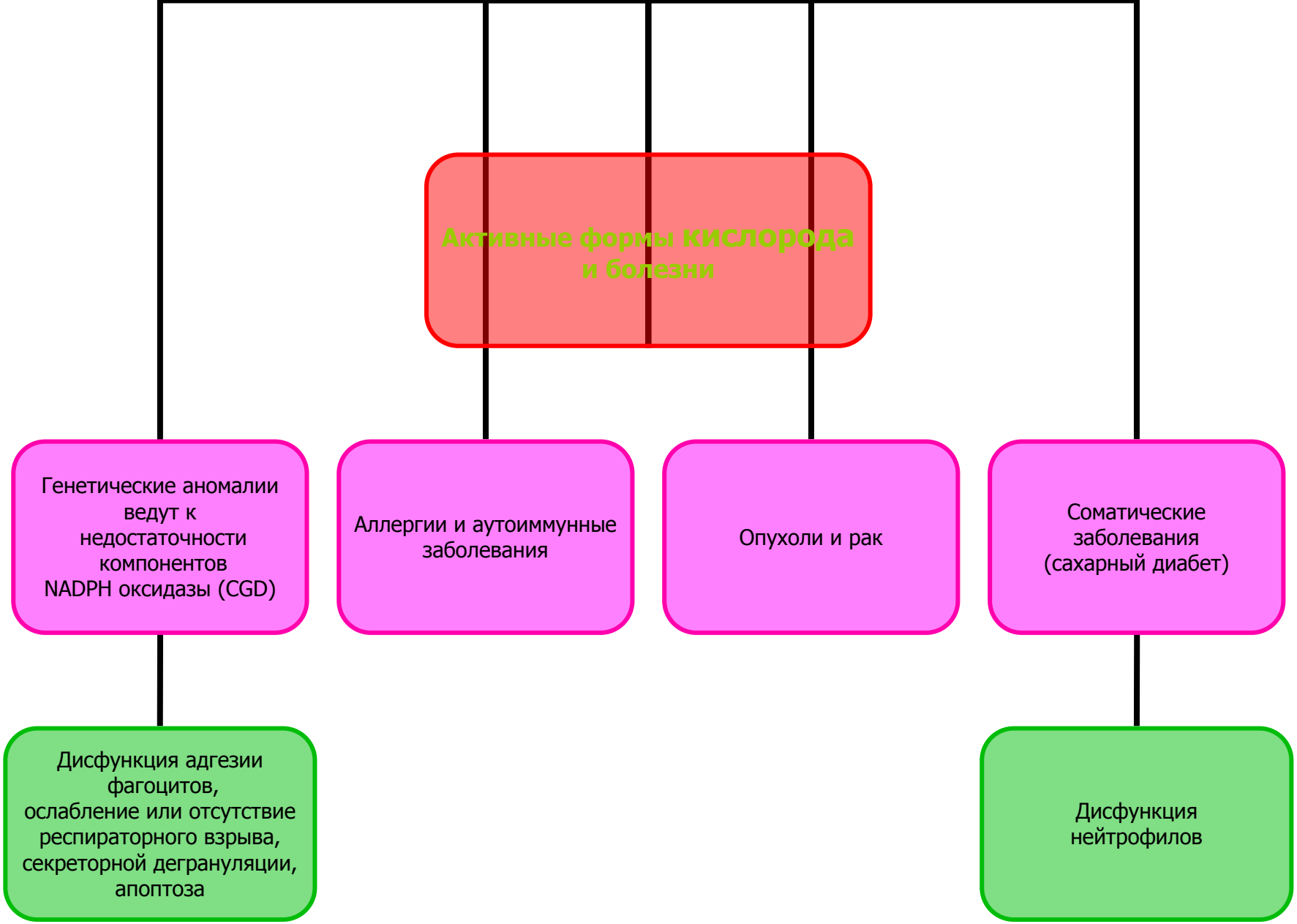
НПФ «МЕДИКОМЕД»

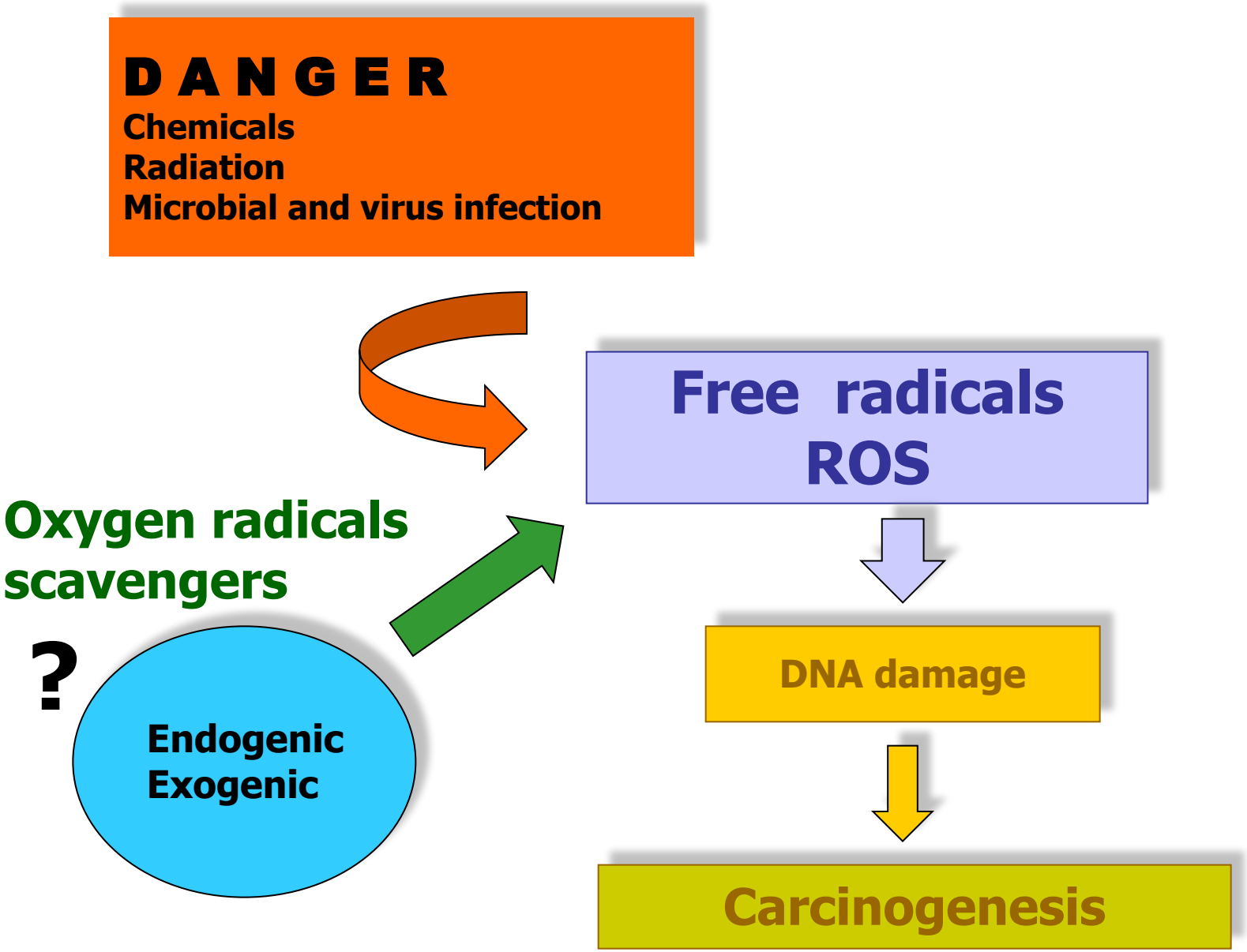
Действие активных форм кислорода (АФК) на клетки и ткани

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



АФК в низких дозах
способствуют выживаемости


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

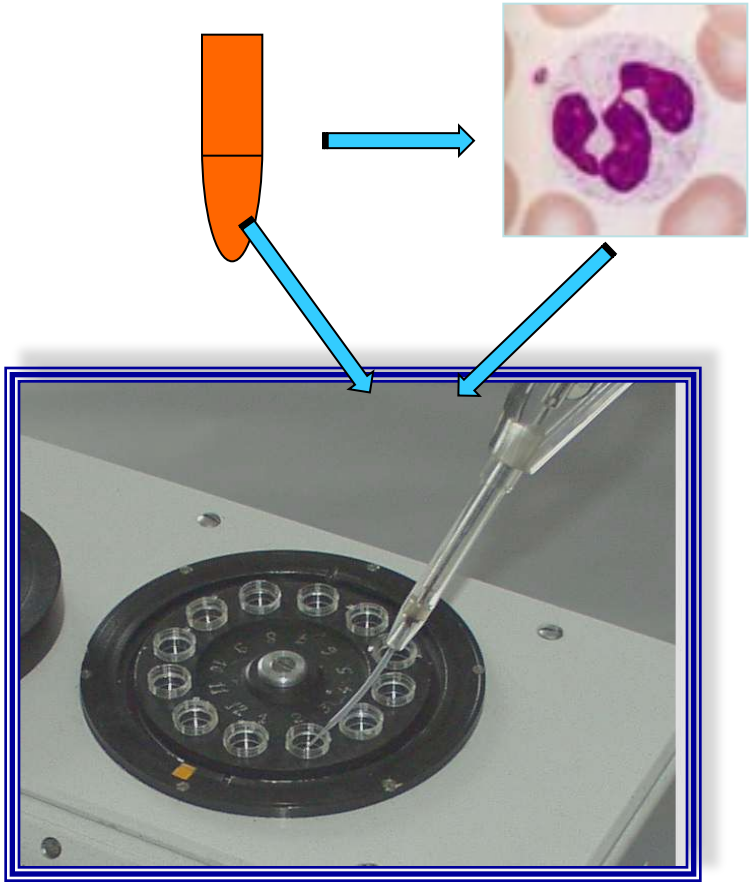

D A N G E R
Chemicals
Radiation
Microbial and virus infection
Free radicals
ROS
Oxygen radicals
scavengers
?
Endogenic
Exogenic
DNA damage
Carcinogenesis

- *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

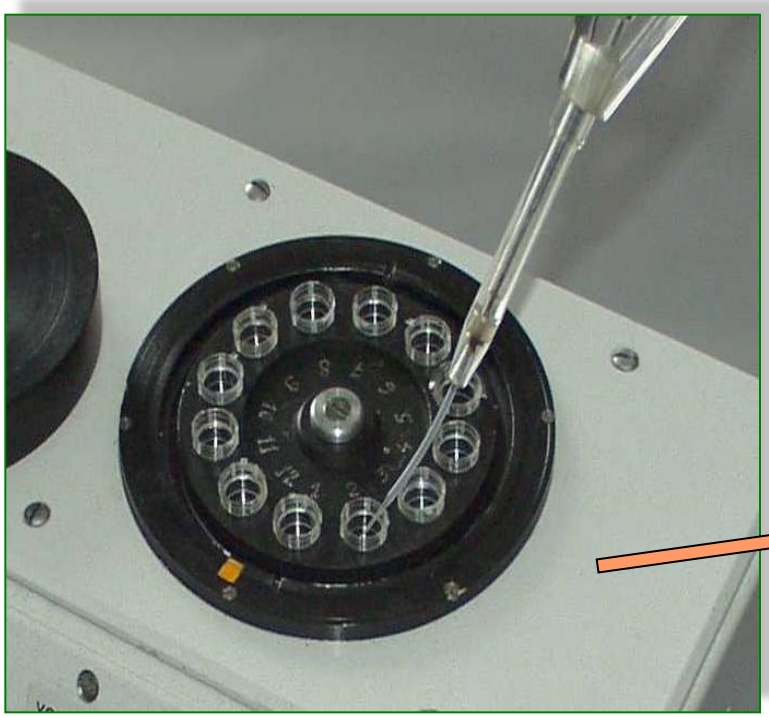
Работа проведена на клетках периферической нефракционированной крови, изолированных гранулоцитах человека
и на модели ферментативной реакции

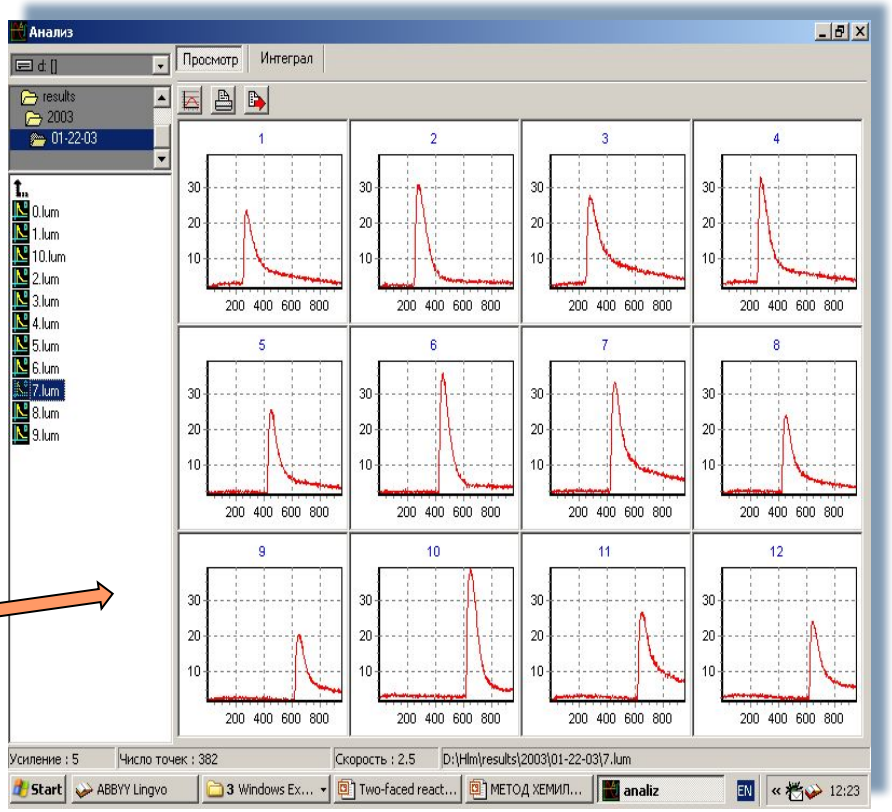


Интенсивность генерации АФК была оценена по люминол-зависимой хемилюминесценции с использованием хемилюминометра ХЕМИЛЮМ-12, который позволяет проводить измерения одновременно в 12 образцах.

Прибор разработан в Лаборатории клеточной нейробиологии Института биофизики клетки РАН.

ХЕМИЛЮМ-12
Хемилюминометр роторный 12-ячеечный



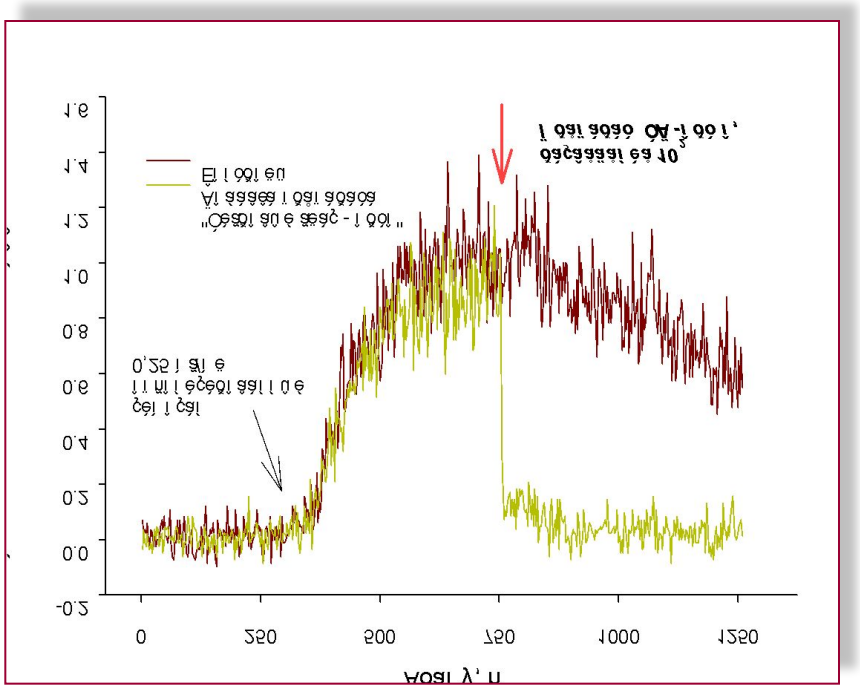


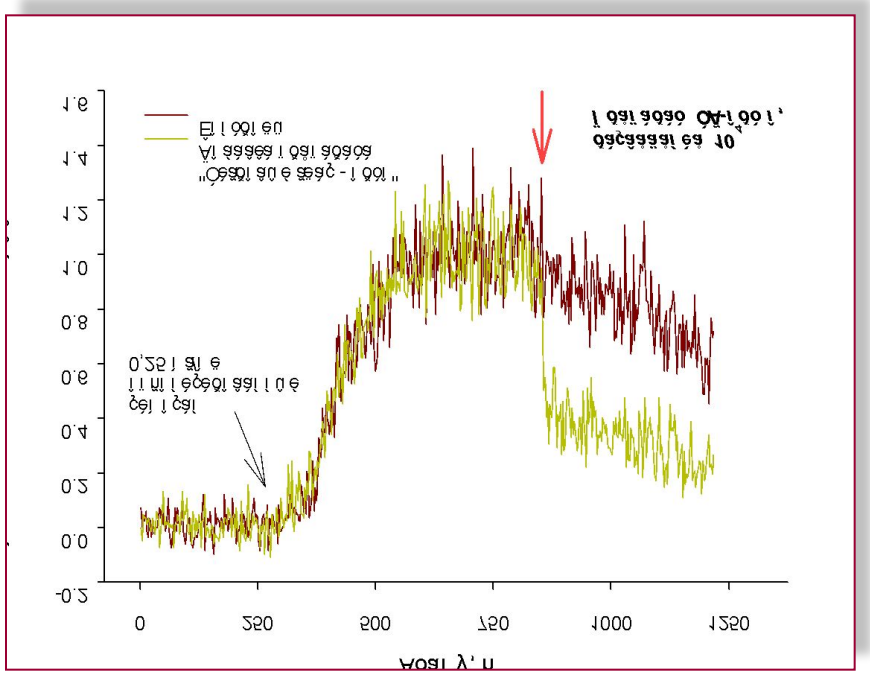
ХЕМИЛЮМ-12 работает с пробами объемом от 0,1 до 0,3 мл, помещаемыми одновременно в 12 ячеек. В процессе регистрации на экране монитора выстраиваются 12 графиков; через каждые 2,5 секунды на каждом из них ставится очередная точка.

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

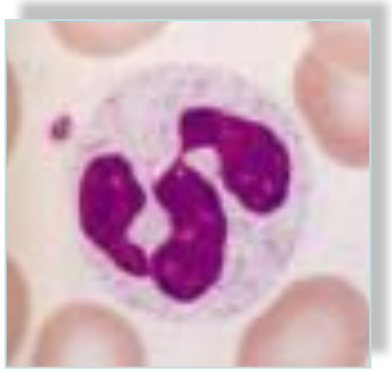
Высокая чувствительность при стабильном уровне нуля, возможность регистрировать быстрые изменения хемилюминесценции, - все это при большом числе одновременно анализируемых проб малого объема - главные отличительные черты прибора.

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

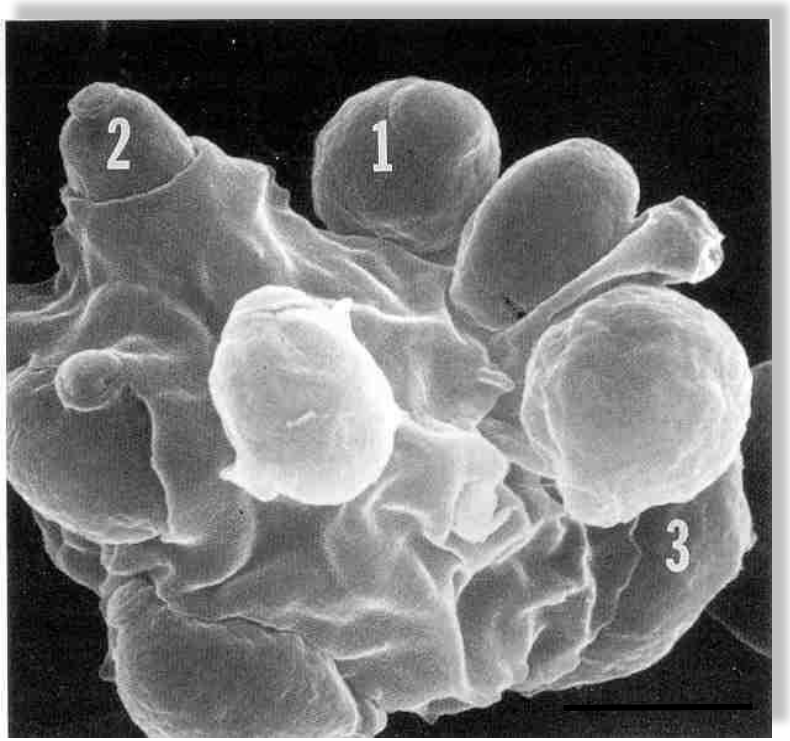




Нейтрофил -
полиморфноядерный нейтрофильный гранулоцит



5 мкм



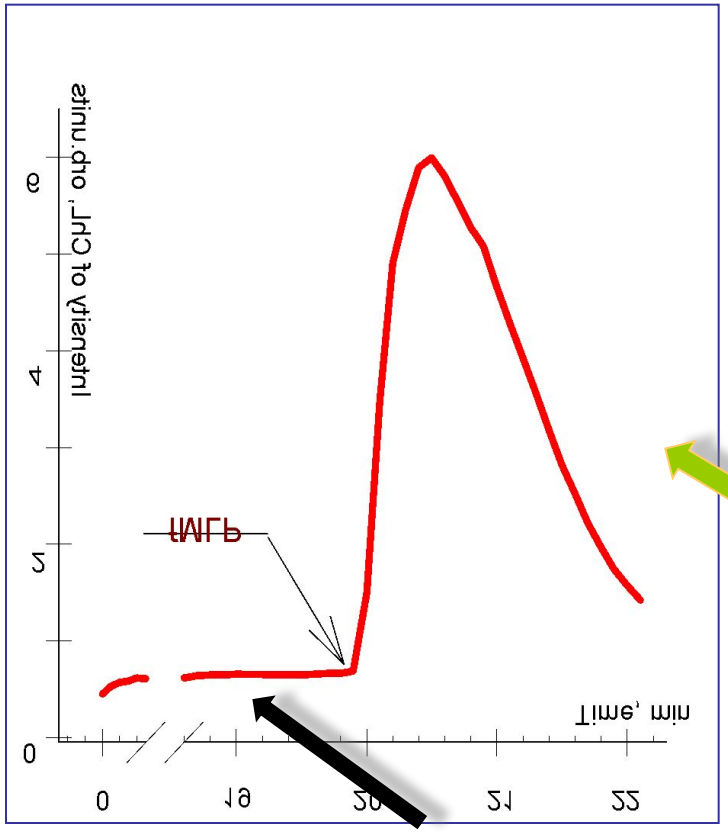
- Фагоцитоз
- Дегрануляция
- Респираторный взрыв

Фагоцитоз зимозана нейтрофилом
(с любезного разрешения Dr. K.B.Pryzwansky)

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

Респираторный взрыв

$$2NADPH + 4O_2 = 2NADP^+ + 4O_2^- + 2H^+$$



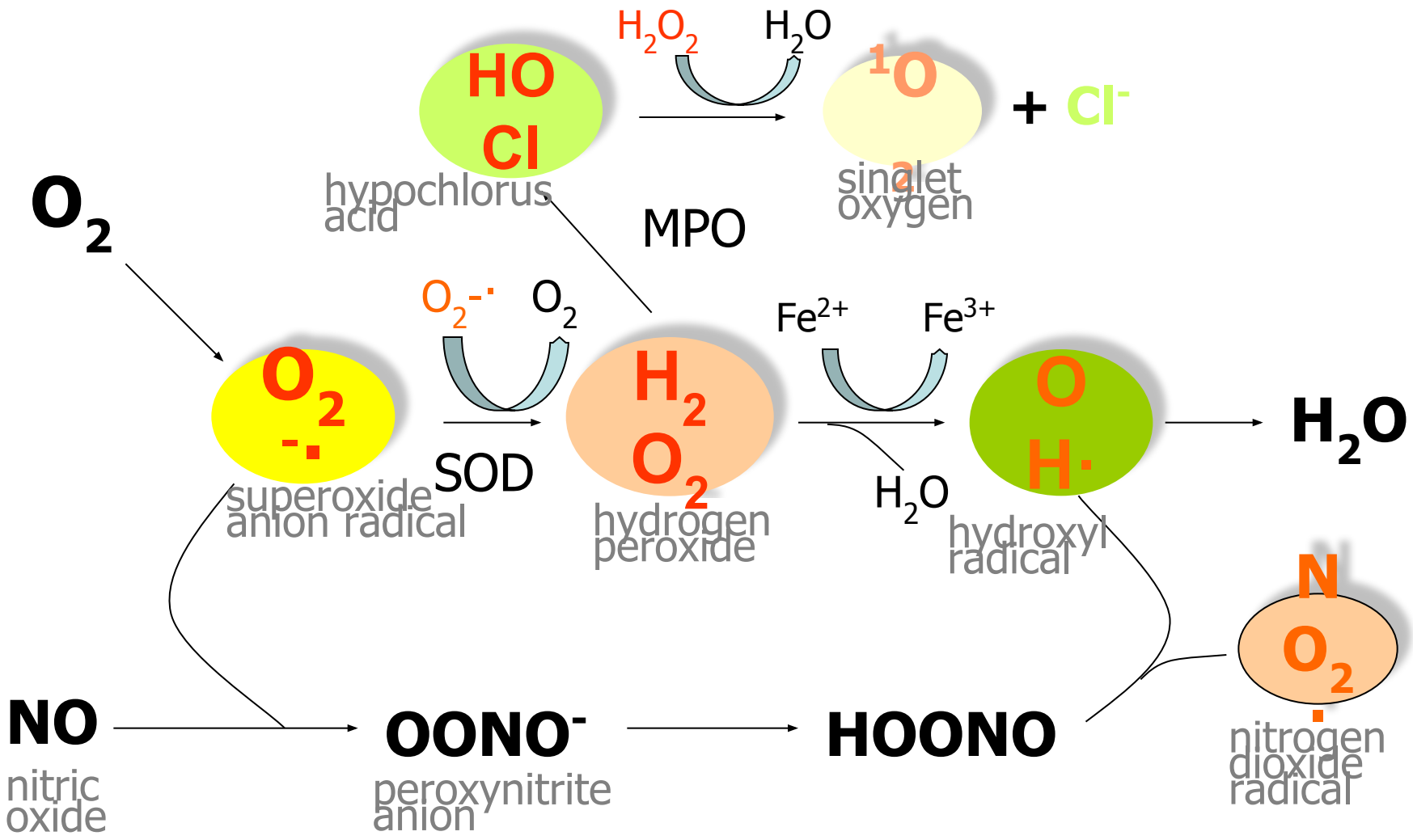
- Повышенная утилизация глюкозы
- Усиленное потребление O_2
- Активация гексозомонофосфатного пути
- Усиленная продукция активных форм кислорода

Активированная продукция АФК

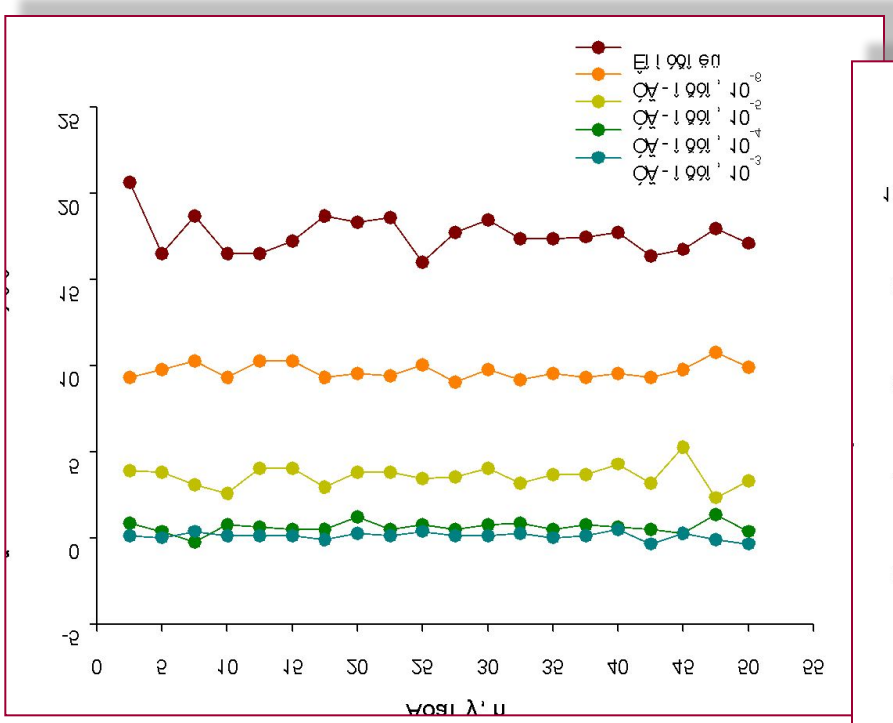
0,5-1 nmol/мин/10^6 клеток

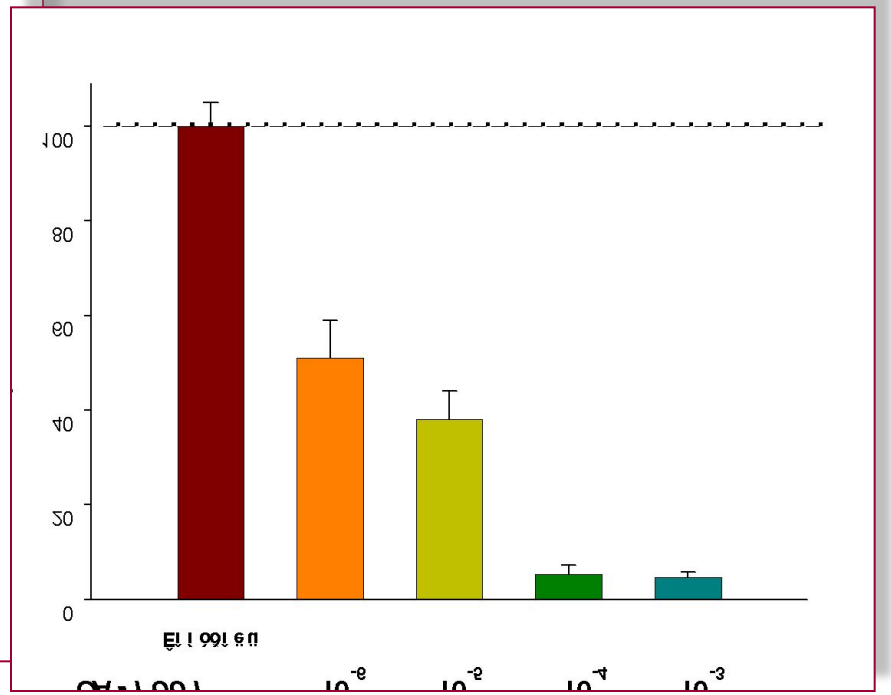
Спонтанный уровень продукции АФК

Реактивные формы кислорода



Антиоксидантные свойства препарата «ТИГРОВЫЙ ГЛАЗ – орто»

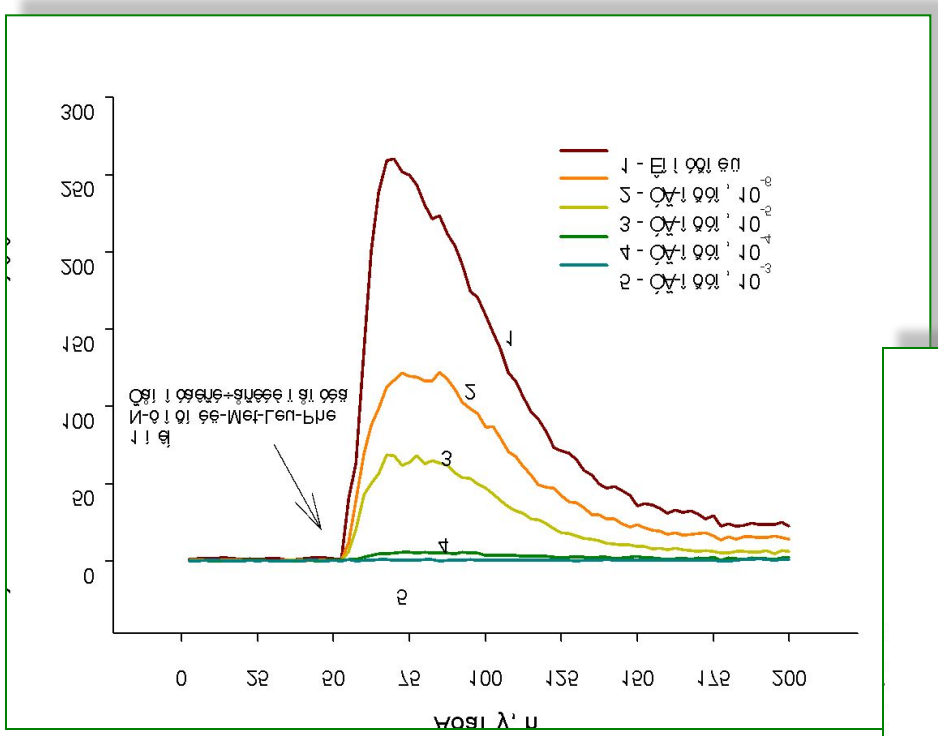




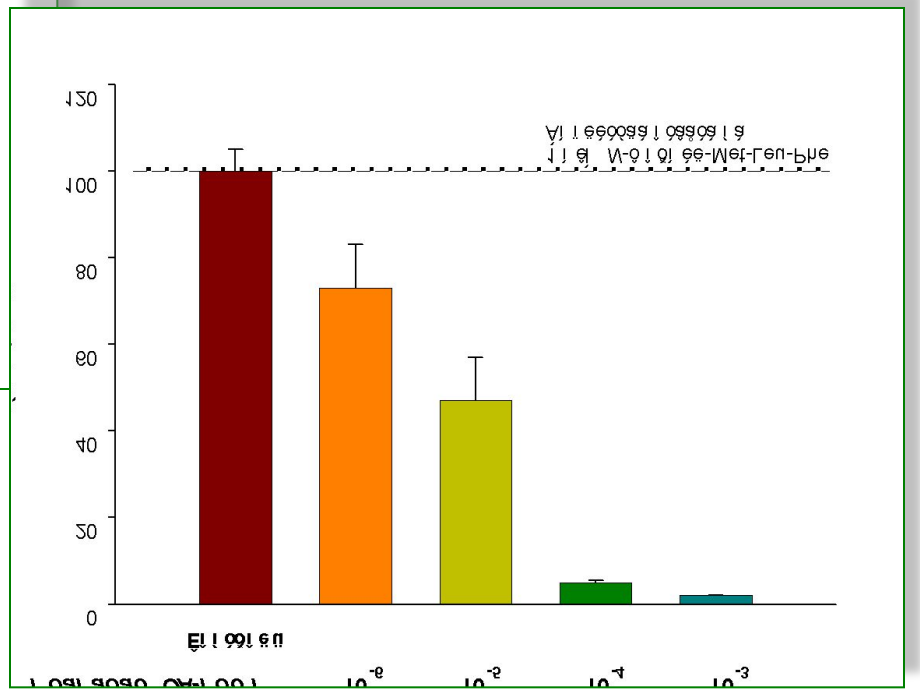
Клетки были инкубированы с ***ТГ-орто*** в возрастающих концентрациях в течение 30 мин при 37°С

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

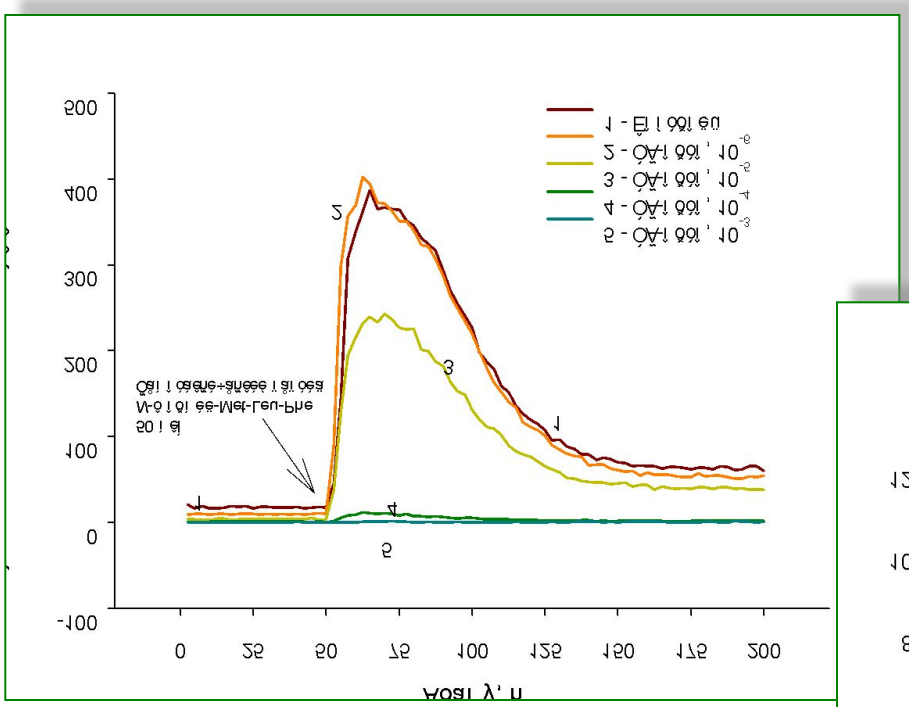


Препарат ТГ-орто
дозозависимо подавляет развитие респираторного взрыва в изолированных гранулоцитах.

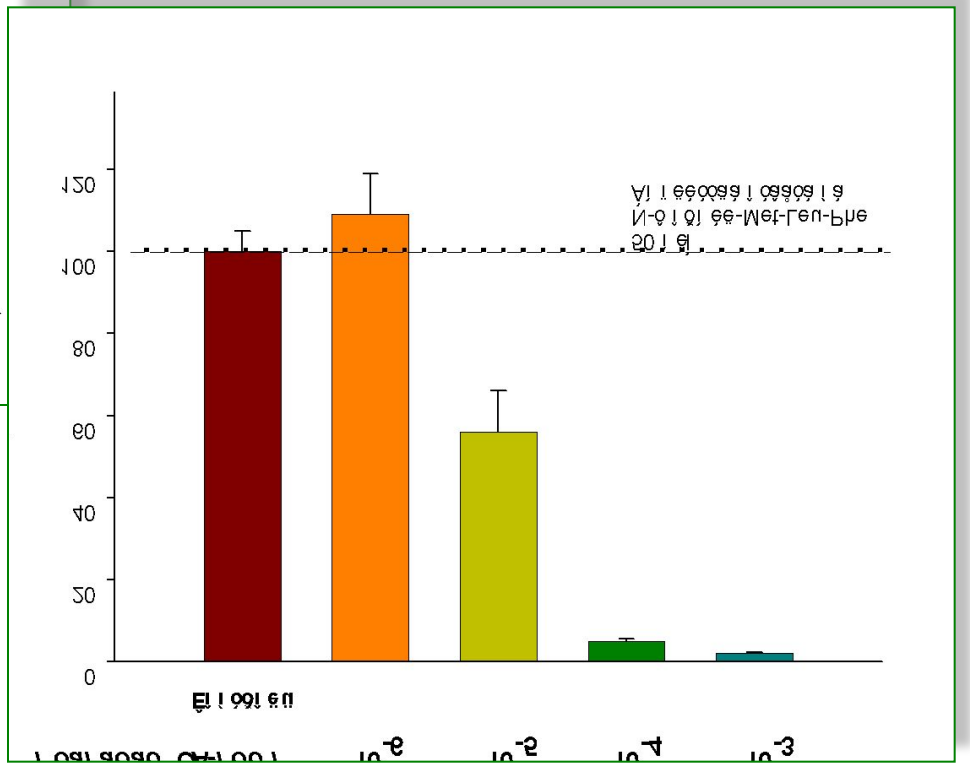


Клетки были инкубированы с
ТГ-орто в различных разведениях
при 37°С в течение 30 мин,
затем активированы 1 мкМ N-формил-Met-Leu-Phe,
чтобы вызвать респираторный взрыв.

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

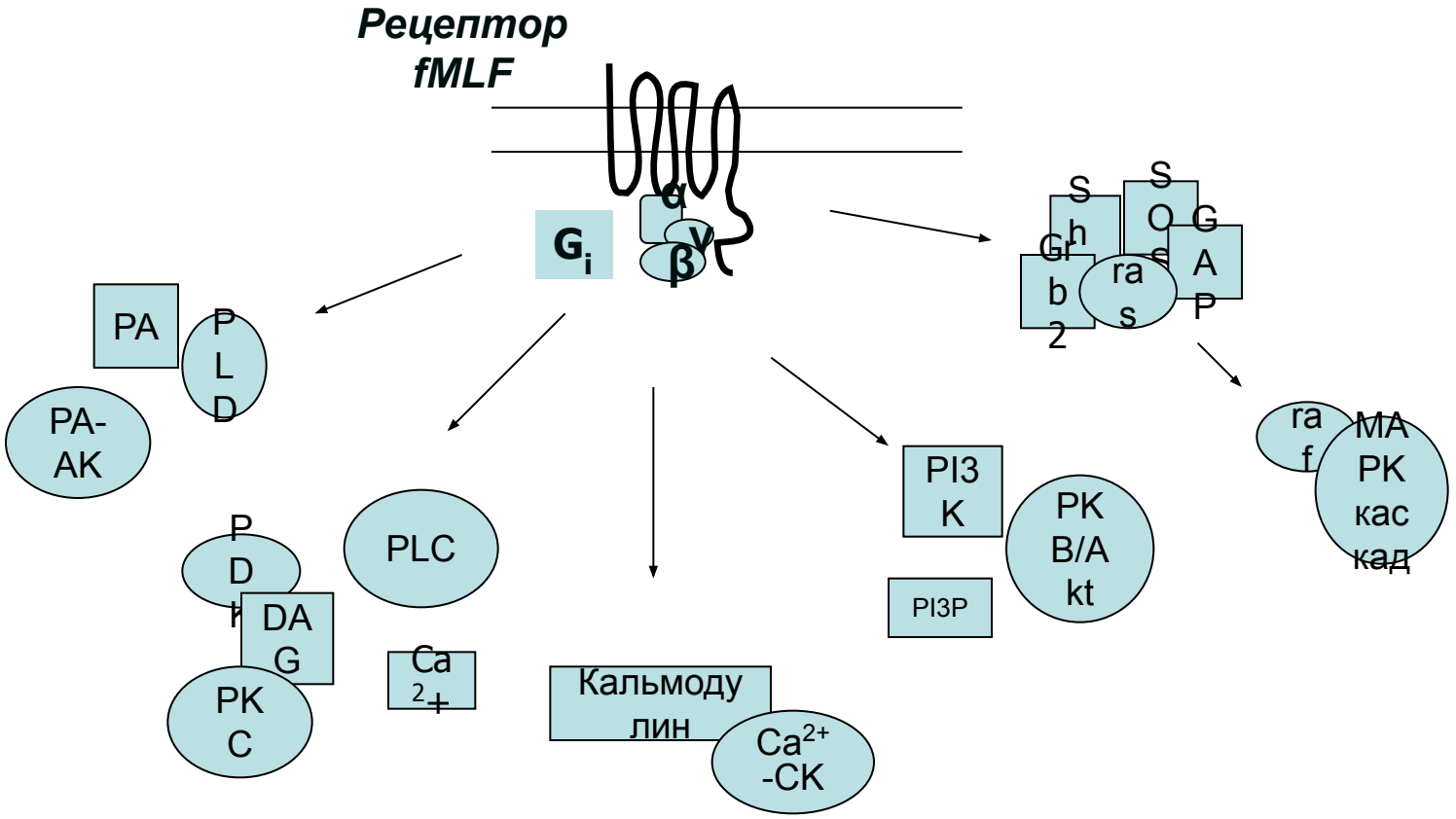


Препарат ТГ-орто
дозозависимо изменяет способность гранулоцитов продуцировать активные формы кислорода
.

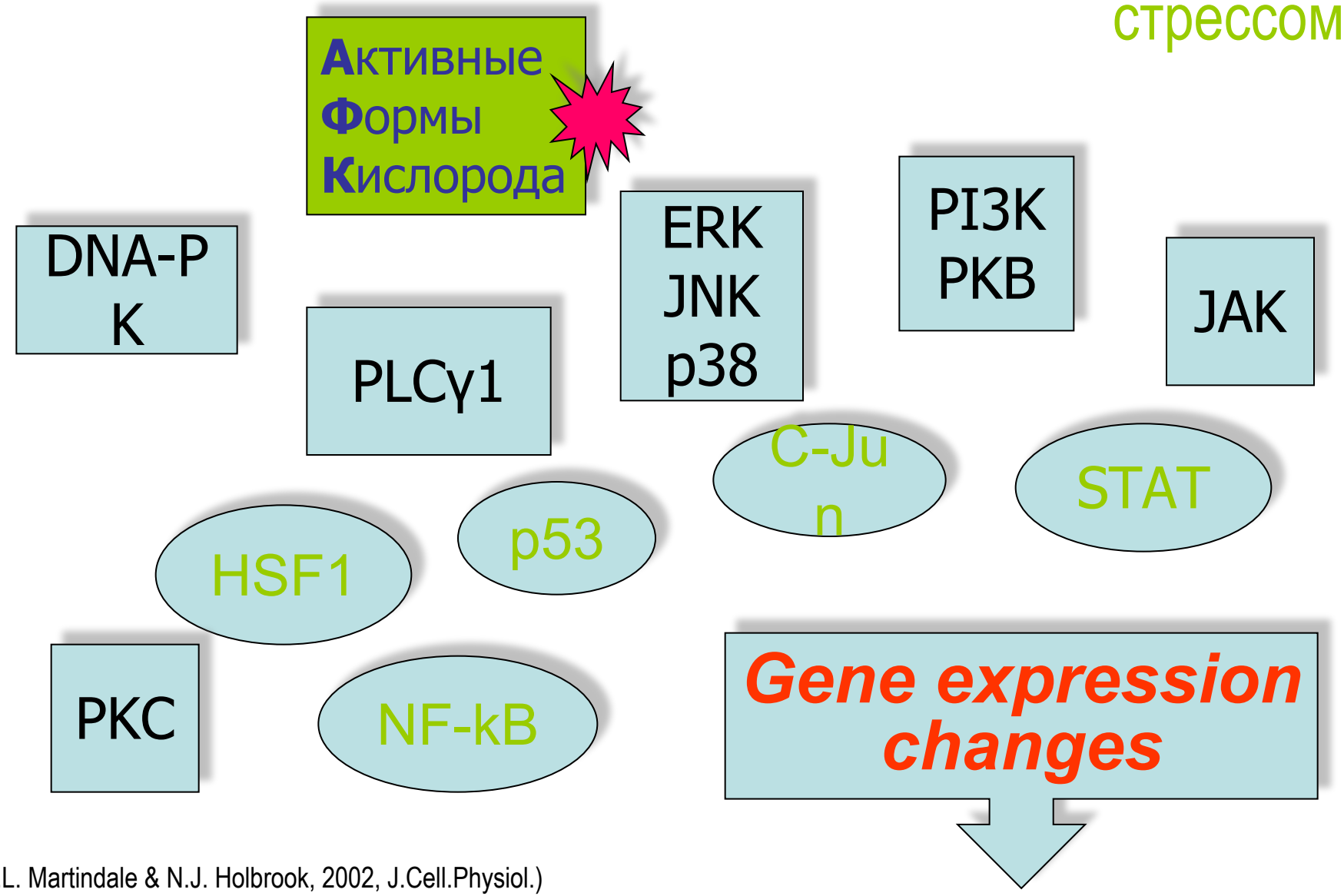


Клетки были инкубированы с
ТГ-орто в различных разведениях
при 37°С в течение 30 мин,
затем активированы 50 мкМ N-формил-Met-Leu-Phe,
чтобы вызвать респираторный взрыв.

Участники передачи сигнала от рецептора fMLF

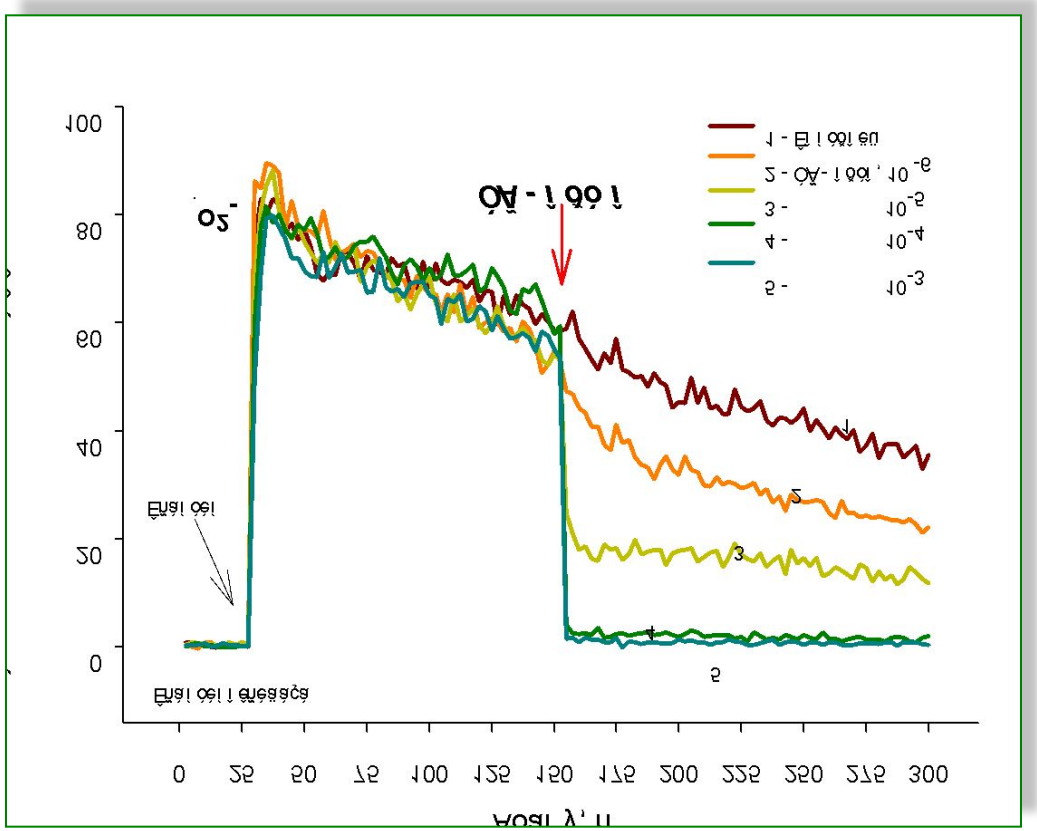


Сигнальные пути, активируемые окислительным стрессом

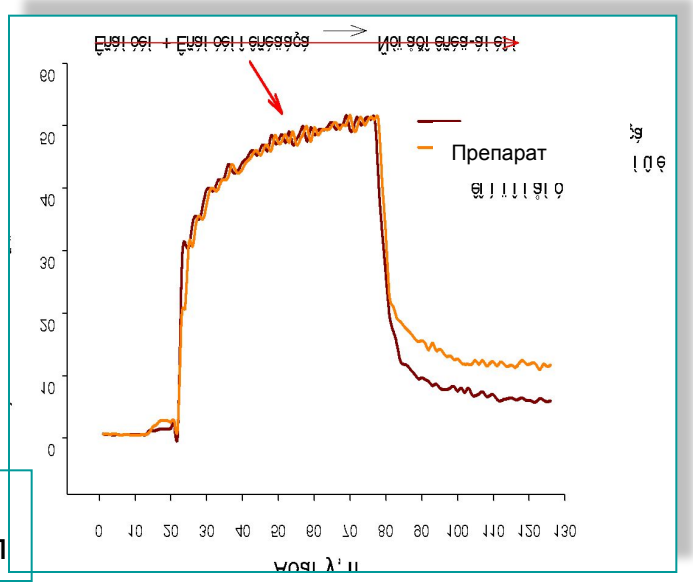


(on J.L. Martindale & N.J. Holbrook, 2002, J.Cell.Physiol.)

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 – ксантиноксидаза».



В реакции «ксантин – ксантиноксидаза» 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.