УДК 57.053

ОЦЕНКА МЕМБРАНОПРОТЕКТОРНОЙ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ЧАЯ

Лесовская М.И.

ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет», Красноярск, e-mail: lesmari@rambler.ru

Оценка физиологических эффектов чая должна учитывать условия проявления радикал-направленной активности, а не только сумму антиоксидантов.. Резистентность эритроцитов к перекисному гемолизу повышалась под влиянием зеленого чая на 25 %, черного чая – на 78 % и снижалась под влиянием каркаде на 16 %, что ограничивает его профилактическое или лечебное использование. При гиперреактивности фагоцитов *in vitro* под влиянием черного чая окислительный дисбаланс корректировался частично, под влиянием зелёного чая – полностью, под влиянием каркаде – усугублялся. При гипореактивности фагоцитов *in vitro* под влиянием черного чая функциональный резерв клеточной резистентности резко снижался, под влиянием зелёного чая – не изменялся, под влиянием каркаде наблюдалась тенденция к нормализации. Мембранотропная и антиоксиантная активность черного чая in vitro связана с элиминацией липопероксидов, в то время как активность зеленого чая и каркаде в радикал-генерирующей системе имеет преимущественно прооксидантный характер.

Ключевые слова: перекисный гемолиз, окислительный стресс, фагоциты, резистентность, хемилюминесценция

THE ESTIMATE OF MEMBRANE-PROTECTIVE ACTIVITY AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF THE VARIOUS TEAS

Lesovskaya M.I.

Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, e-mail: lesmari@rambler.ru

To evaluate effects the specific conditions were investigated in which the components of the tea are interact with free radicals. In the model of hemolysis it was shown that using green tea the resistance of membrane of erythrocytes was increased by 25 %, using black tea the result was increased by 78 %. Under the influence of Hibiscus the result was reduced by 16 %. This fact limits using of Hibiscus for the prophylactic or therapeutic aims. In the model of highly activated phagocytes under the influence of black tea the oxidation imbalance was corrected in part, under the influence of green tea it was corrected completely, and under the influence of Hibiscus was not corrected absolutely. Under the model of weakly activated phagocytes under the influence of black tea the functional activity of the cell declined sharply, under the influence of green tea was not changes, under the influence of Hibiscus the trend to normalize was obtained. The membranotropic and antioxidant activity of black tea in vitro depends of the velocity of elimination of lipid peroxides, while the activity of green tea and hibiscus in the radical-generating system has substantially prooxidant character.

Keywords: peroxide hemolysis, oxidative stress, phagocytes, resistance, chemiluminescence

Окислительный стресс, индуцированный усилением эндогенной продукции активных форм кислорода (АФК), является основным фактором развития многих заболеваний (рак, атеросклероз, язва желудка, аллергии, ускоренное старение и пр.) на фоне прогрессирующего снижения функций иммунной системы. Защиту от свободных радикалов (СР) обеспечивает антиоксидантная система организма, которая наряду с ферментами и витаминами включает алиментарные антиоксиданты (АО). Среди них по физиологической активности лидируют флавоноиды, которые по антиоксидантной способности *in vitro* превосходят аскорбат и α-токоферол благодаря способности отдавать электроны или атомы водорода; установлено, что окислительный стресс способствует накоплению флавоноидов в растениях, например, в листьях чая [7]. С другой стороны, экспериментальные доказательства антиоксидантной функции флавоноидов в растениях и фитоэкстрактах малочисленны и плохо сопоставимы, поэтому вопрос остаётся дискуссионным [10]. Это оставляет место для манипуляций: маркетинговые и рекламные службы голословно присваивают своим продуктам антиоксидантные свойства для продвижения их на рынок.

Пищевые антиоксиданты обеспечивают наиболее физиологичную регуляцию гомеостаза через компоненты повседневного рациона, например чай. В широком смысле чаем именуют любой напиток, приготовленный путём горячей экстракции не только листьев чайного куста *Camellia sinensis,* но и разнообразных культурных растений, дикоросов, эндемиков и экзотов. Объединяющим свойством разнообразных сортов чая считают доминирование флавоноидов в водорастворимой экстрагируемой части.

Ассортимент чайной продукции в России стремительно расширился около 20 лет

назад. По данным компании «*Nielsen* Россия» [5], более 70 % консолидированного российского чайного рынка контролируют четыре компании, среди которой видное место принадлежит дистрибьюторам торговой марки *Ahmad*. На чайных этикетках всё чаще можно обнаружить рекламную информацию о рекордном содержании антиоксидантов. Возникают вопросы: во-первых, можно ли проверить подобные декларации, и если да, то как; во-вторых, является ли высокое содержание антиоксидантов в продукте гарантией безопасности, качества и пользы для здоровья потребителя.

Положительный ответ на первый вопрос предполагает выбор методов, позволяющих одновременно сравнить АО активность различных объектов в единых стандартизируемых условиях. Такую возможность предоставляет моделирование *in vitro* процессов перекисного гемолиза (в системе Fe^{2+}/аскорбат), а также продукции АФК стимулированными фагоцитами или в реакции распада пероксида водорода (модель Фентона). Практическое применение этих моделей для тестирования чайных экстрактов, природных накопителей флавоноидов, позволит попытаться найти ответ на второй вопрос.

Целью данной работы было оценить мембранопротекторные и антиоксидантные свойства различных сортов чая (черный, зелёный, каркаде) *in vitro* в стандартизированных условиях моделей биогенных свободнорадикальных процессов.

Задачи исследования включали оценку:

1) изменений гемолиза эритроцитов под влиянием различных сортов чая с помощью фотоколориметрического анализа в модельной системе $FeSO_4$+аскорбат;

2) влияния различных сортов чая на кинетику продукции АФК в химической либо биогенной (гипер- и гипостимулированные фагоциты крови) моделях Фентона ($H_2O_2 + Fe^{2+}$).

Материалы и методы исследования

В работе использованы образцы трёх сортов чая компании «*Ahmad*»: черный и зелёный байховые листовые, а также чай каркаде (экстракт *Hibiscus sabdariffa*). Чайные экстракты готовили из расчёта 2 г чая на 200 мл воды, и настаивали 10 минут. Для определения осморезистентности эритроцитов готовили суспензию эритроцитов: 50 мкл крови из пальца разбавляли в 1 мл 0,9 % NaCl при быстром перемешивании для предотвращения коагуляции. Суспензию разбавляли в 100 раз, что позволяло не отмывать эритроциты центрифугированием. Для изучения мембранопротекторных свойств чая использовали модель железо/аскорбат-индуцированного перекисного окисления (ПОЛ) мембран эритроцитов [3] в авторской модификации. В рабочую кювету помещали 5 мл разбавленной эритроцитарной суспензии со стартовой оптической плотностью 0,260. К суспензии добавляли 0,1 мл чайного экстракта или физраствора (контроль), 0,1 мл 0,1 н. смеси для индуцирования гемолиза 2,6 Мм аскорбата и 0,4 мкМ соли Мора (сульфата железа). Оптическую плотность регистрировали на фотоколориметре КФК-2 спустя 15 мин. от момента инициации. Мембранотропное влияние оценивали по изменению оптической плотности в условных единицах относительно стартового уровня (100 усл. ед.) и контроля (20 усл. ед.).

Для ингибиторного хемилюминесцентного анализа использовали аппаратурно-измерительный комплекс «БХЛ-3606 М» (Красноярск, Россия), работающий в режиме счета квантов света. В химической модели Фентона [1] реакционная смесь содержала 5 мкМ пероксида водорода, 50 мкМ Fe^{2+}, 100 мкм люминола и 50 мкл исследуемого препарата или среды Хенкса (контроль). В биогенной модели метаболическую активность цельной крови (1 мкл /1 мл среды Хенкса) анализировали методом латекс-стимулированной люминолзависимой хемилюминесценции, при исследовании базального ответа клеток латекс не добавляли. Условия и последовательность анализа подробно описаны [6]. Хемилюминесценция крови определяется реактивностью фагоцитирующих нейтрофилов, поэтому в работе использовали образцы цельной периферической крови (из пальца). При этом лейкоциты не выделяли из состава крови, поскольку ранее было показано, что ХЛ цельной крови и нейтрофильной массы достоверно не различаются [6]. При оценке функциональной активности фагоцитов (гипер- или гипореакивный ответ) использовали референтные значения нормы, установленные ранее [8]. Все анализы проводили не менее чем в 10 повторностях, данные обрабатывали с использованием критерия Стьюдента, его применимость установлена по характеру распределения и сопоставимости дисперсий выборок. Результаты считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Пероксидация мембранных липидов лежит в основе увеличения осмотической хрупкости эритроцитов и последующих автокаталитических стадий окислительного стресса. Следовательно, профилактическое значение будут иметь соединения, способные затормозить АФК-зависимую деструкцию мембраны. Результаты оценки данной способности приведены на рис. 1. Чай служит физиологичной формой транспортировки в организм легкорастворимых и метаболически доступных антиоксидантов, обладающих функциональной двойственностью в зависимости от степени окисления. Результат трудно формализовать, но он доступен для физического моделирования при различном (гипер- или гипопродуктивном) уровне генерации АФК фагоцитами крови (рис. 2).

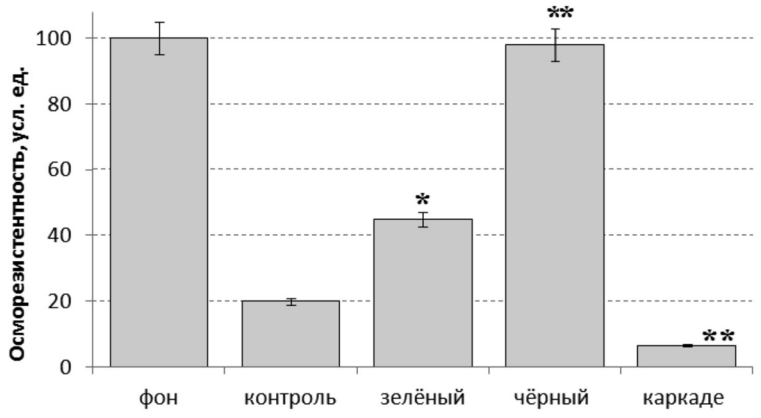


Рис. 1. Эффективность кислотного гемолиза эритроцитов в системе $FeSO_4$ + аскорбат под влиянием различных сортов чая

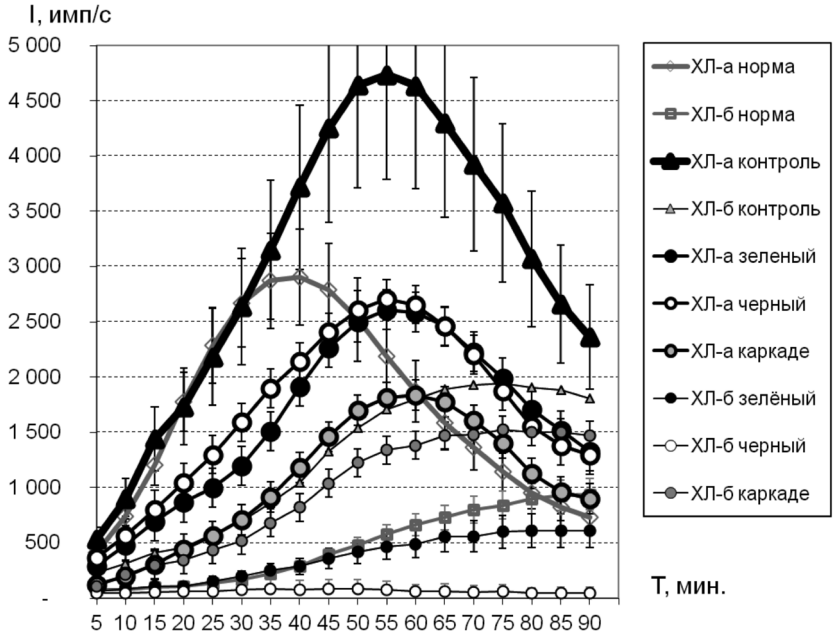


Рис. 2. Снижение продукции СР гиперактивными фагоцитами крови под влиянием различных сортов чая

В модели перекисного гемолиза (рис. 1) оценили, что резистентность эритроцитарных мембран повышается под влиянием зелёного и черного чая: снижение оптической плотности суспензии составило 45 % и 98 % соответственно, тогда в контроле – 20 %. Эффект черного чая был вдвое выше, хотя содержание экстрактивных веществ (полифенолы, витамины, органические кислоты) в этих продуктах практически одинаково, а сумма антиоксидантов в зелёном чае выше [7].

Результаты объяснимы с учётом типологии ингибиторного действия антиоксидантов [4]. Мощный радикал-ингибирующий эффект чёрного чая может быть обусловлен в первую очередь биофлавоноидами – избирательными элиминаторами липопероксидов, возникающих при индуцированном перекисном гемолизе. Зелёный чай отличается от чёрного более высоким содержанием протеинов и органических кислот, имеющих иные механизмы антиоксидантного действия. В частности, они хелатируют металлы переменной валентности, являющиеся триггером цепного окисления. В использованной модели первичным актом является нарушение целостности мембра-

ны, а гемолиз и его последствия вторичны. Поэтому можно полагать, что полифенолы взаимодействовали с продуктами липопероксидации практически с момента инициации СРО в модели, а активность антиоксидантнов зеленого чая могла проявиться только после освобождения железа из гема, поэтому результат был ниже.

Таким образом, для оценки полезности этих продуктов больший смысл имеет сопоставление условий проявления антиоксидантной активности, а не абсолютной суммы антиоксидантов, на чём нередко делают акцент диетологи, маркетологи и дистрибьюторы.

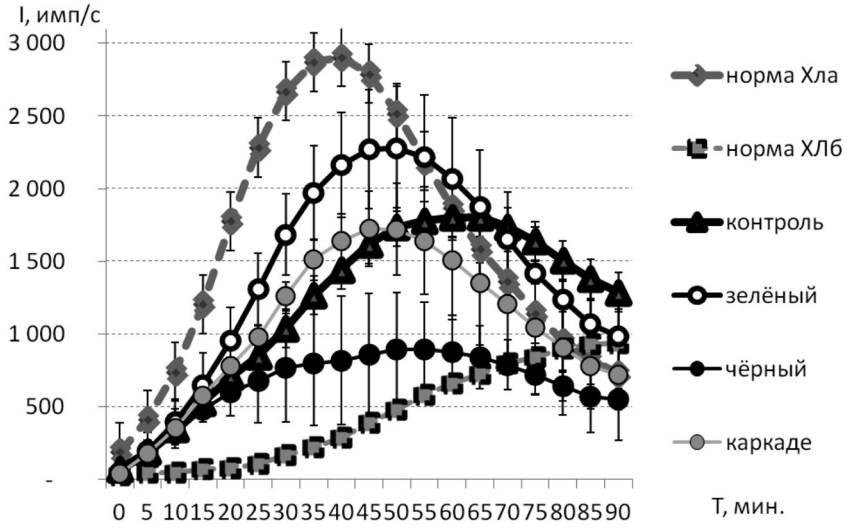
Под влиянием чая каркаде (рис. 1) резистентность мембран не только не возрастала, но напротив, снижалась на 16% ($p < 0,05$). В отличие от черного и зеленого сортов чая, в экстракте каркаде до 45% сухой массы составляют органические кислоты с сильным антибактериальным действием [11]. Экстракт гибискуса известен с древности как одно из средств лечения цистита. Однако бактерицидное действие обусловлено не антиоксиантами, а прооксидантами [9], роль которых выполняют органические кислоты. Таким образом, мембранопротекторная активность обнаружена у сортов чая, богатых биофлавоноидами, тогда как эффект чая каркаде, доминирующего по содержанию органических кислот, был обратным. Подобное влияние *in vivo* может быть сопряжено с риском внутрисосудистого гемолиза. Естественная адаптация организма человека к подобным фитонутриентам в ареалах произрастания (Еипет, Индия) веками происходила в специфических условиях природной среды (жаркий климат, инфекционные риски). Не исключено, что использование подобных продуктов по соображениям эстетики или моды в рационе жителей средних широт может быть сопряжено с риском нарушений гомеостаза.

Исчерпаемые метаболические ресурсы резистентности организма человека должны ежедневно пополняться за счёт алиментарных антиоксидантов и прооксидантов. Мониторинг баланса этой динамической системы осуществляли по показателям функциональной активности клеточного (фагоцитарного) звена неспецифического иммунитета. Ранее было показано на репрезентативной выборке ($n = 1168$, мужчины и женщины 18–60 лет), что только у 14% обследованных реактивность фагоцитов находится в норме, тогда как у 80% наблюдаются признаки окислительного стресса, (гиперпродукция АФК фагоцитами), а у 6% – истощение функционального резерва фагоцитов, фактически означающее предболезнь, «третье состояние» здоровья.

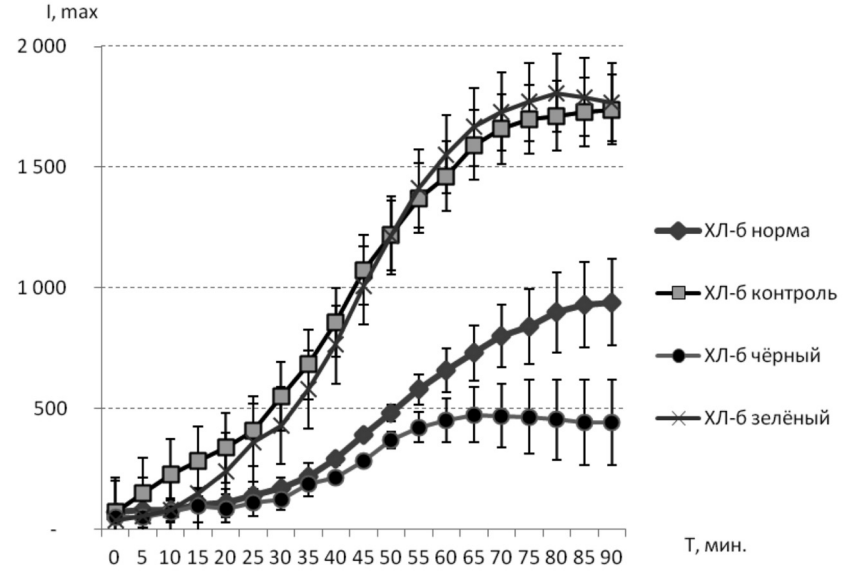
Под влиянием черного и зеленого сортов чая кинетика продукции гиперстимулированных фагоцитов по высоте пика (I_{max}) и площади под кривой (S) снижалась на 45% и 48% соответственно до нормы при сохранении временного сдвига: $T_{max} = 55$ мин. при норме 39 мин. (рис. 2). Это может означать, что влияние препаратов на продукцию биогенных радикалов является скавенджерным, т.е. они воздействуют на конечные, а не первичные этапы свободнорадикального каскада и скорее всего не влияют на активацию мембраносвязанной оксидазы фагоцитов. Под влиянием каркаде светосумма составила 56% (4,6 млн. имп.) от нормы. Результаты согласуются с полученными в описанной выше модели гемолитического стресса и позволяют предполагать, что регулярное употребление данного чая может привести к функциональной инертности клеточного звена резистентности, создавая предпосылки для патологии. При этом оценочное значение имеют не столько абсолютные величины высоты пика или светосуммы, сколько их соотношение (резервный коэффициент $РК_I$) как характеристика функционального резерва клеточного звена резистентности. Референтное значение $РК_I$ составляет 14,5 [6]. В описанных модельных условиях величины $РК_I$ под влиянием сортов чая составили 1,3 (каркаде); 5 (чёрный); 14 (зелёный). Таким образом, на фоне гиперпродуктивности фагоцитов зелёный чай является наиболее эффективным алиментарным регулятором окислительного баланса внутренней среды. На рис. 3 и 4 представлены результаты ингибиторного ХЛ-анализа трёх изучаемых образцов в биогенной (рис. 3) или хемогенной (рис. 4) моделях Фентона.

Из рис. 3 видно, что при низком исходном уровне продукции АФК под влиянием чёрного чая тушение ХЛ наблюдалось как в активированных (рис. 3, а), так и в базальных условиях (рис. 3, б). В то же время под влиянием зелёного чая параметры кинетики достоверно не изменились, а под влиянием каркаде наблюдалась тенденция к усилению продукции АФК. Можно ожидать, что *in vivo* на фоне гипореактивности фагоцитов пищевое предпочтение чая каркаде будет оправданным. Разброс потребительских отзывов о вкусовых и регуляторных свойствах чая каркаде может быть обусловлен не только самим нутриентом, но и условиями его взаимодействия с внутренней средой организма. Судя по полученным данным, антиоксидантный потенциал каркаде реализуется на фоне гипопродукции, но не гиперпродукции АФК фагоцитами. Извест-

но, что гиперактивные фагоциты работают по принципу «камикадзе» [2], поэтому липопероксиды (обломки мембран) будут составлять среди АФК более высокую долю, чем среди СР-продуктов гипопродуктивных («ленивых») фагоцитов. Это согласуется с описанным выше результатом, полученным в модели гиперпродукции АФК, где эффективными регуляторами окислительного баланса были черный и зелёный сорта чая (биофлавоноиды которых специфичны к липопероксидам). Можно предположить, что в модели гипопродукции АФК (рис. 3) под влиянием органических кислот каркаде первичные радикальные процессы, напротив, каскадно усиливаются, в результате радикалы взаимно уничтожают друг друга [4], что и было косвенно подтверждено на химической модели Фентона, не содержащей липопероксиды (рис. 4). Эффекты каркаде и зелёного чая носили прооксидантный характер, тогда как присутствие чёрного чая достоверно не изменило уровень свободных радикалов.



а)



б)

Рис. 3. Снижение продукции АФК гипореактивными фагоцитами крови под влиянием различных сортов чая. а – ХЛ активированная, б – ХЛ базальная

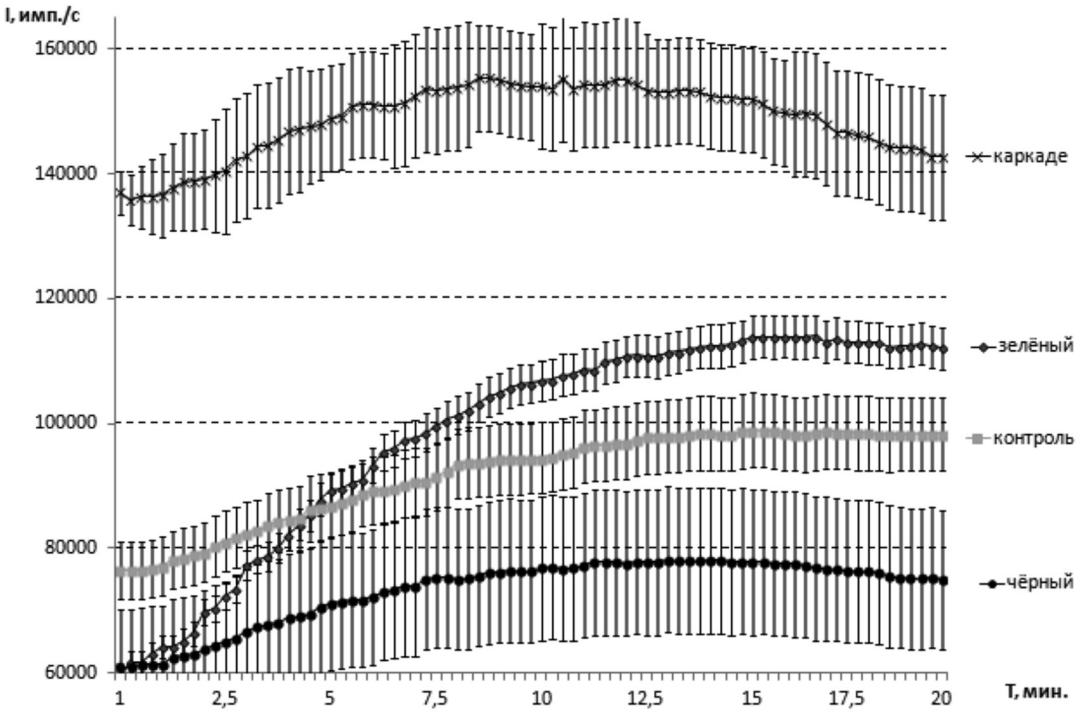


Рис. 4. Кинетика продукции АФК в модели Фентона под влиянием различных сортов чая

Выводы

Резистентность эритроцитов к перекисному гемолизу повышается под влиянием зеленого чая на 25%, черного чая – на 78% и снижается под влиянием каркаде на 16%, что ограничивает его использование в качестве профилактического или лечебного пищевого продукта. Для оценки физиологических эффектов чая важное значение имеют условия проявления антиоксидантной активности, а не только абсолютная сумма антиоксидантов в их составе. При гиперреактивности фагоцитов *in vitro* под влиянием черного чая окислительный дисбаланс корректировался частично, под влиянием зелёного чая – полностью, под влиянием каркаде – усугублялся. При гипореактивности фагоцитов *in vitro* под влиянием черного чая функциональный резерв клеточной резистентности резко снижался, под влиянием зелёного чая – не изменялся, под влиянием каркаде наблюдалась тенденция к нормализации. Мембранотропная и антиоксидантная активность черного чая связана с элиминацией липопероксидов, тогда как влияние зеленого чая и каркаде в большей степени обусловлены прооксидантными эффектами.

Список литературы

1. Аристова Н.А., Иванова И.П., Трофимова С.В., Князев Д.И., Пискарев И.М. Люминол-зависимое свечение, сопровождающее реакцию Фентона // Исследовано в России: электронный журнал. – 2011, 2008. – С. 77–86. http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2011/008.pdf.

2. Герасимов И.Г., Игнатов Д.Ю. Функциональная неравнозначность нейтрофилов крови человека: генерация активных форм кислорода // Цитология. – 2001. – № 43 (5). – С. 432–436.

3. Горбунова М.Н., Аникина Л.В. Синтез и антиоксидантная активность сополимеров новых структурных типов // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 4. – С. 24–27.

4. Денисов Е.Т. Радикальные реакции в химии, технологии и живом организме. Лекция 14. – Черноголовка, 2003. – С. 89–101.

5. Инкижинова С. Экспертный чай из России // Эксперт: электронный журнал. – 2010, 15 ноября. – 2010. http://expert.ru/expert/2010/45/ekspertnuy_chay_iz_rossii/.

6. Лесовская М.И. Адаптационный потенциал неспецифической резистентности здоровых людей при различных функциональных нагрузках и состояниях организма: монография. – Красноярск, РИО КГПУ, 2003. – 248 с.

7. Масленников П.В., Чупахина Г.Н., Скрыпник Л.Н., Федураев П.В., Селедцов В.И. Экологический анализ активности накопления биофлавоноидов в лекарственных растениях // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. – 2014. – Вып. 7. – С. 110–120.

8. Пухов К.И., Макарская Г.В., Яхнина Е.И., Пухова Я.И. Хемилюминесцентный анализ кинетики генерации активных форм кислорода клетками цельной крови при возмещаемых эксфузиях крови // ДАН. – 1991. – Т. 316. – № 1.

9. Шарапаева М.С., Лесовская М.И. Бактерицидность и радикалотропность эфирных масел сосны, эвкалипта и лимона // Вестник КрасГАУ. – 2012. – № 2. – С. 290–294.

10. Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F., Munné-Bosch S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? // Trends in Plant Science. – 2009. – Vol. 14, Issue 3. – P. 125–132.

11. Polishchuk G., Pertsevy F., Prasol D. Investigation of conditions for production of hibiscus extracts / Risk and Efficiency in Economy Practice: Proceedings of the 17th «George Baritiu» University Invernational Conference on control, development and applied informatics in business and economics, Brasov, Romania, November 24–24, 2011 (CDAIBE'11).

References

1. Aristova N.A., Ivanova I.P., Trofimova S.V., Knjazev D.I., Piskarev I.M. Ljuminol-zavisimoe svechenie, soprovozhdajushhee reakciju Fentona // Issledovano v Rossii: jelektronnyj zhurnal. 2011, 2008. pp. 77–86. http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2011/008.pdf.

2. Gerasimov I.G., Ignatov D.Ju. Funkcional'naja neravnoznachnost' nejtrofilov krovi che-loveka: generacija aktivnyh form kisloroda // Citologija. 2001. no. 43 (5). pp. 432–436.

3. Gorbunova M.N., Anikina L.V. Sintez i antioksidantnaja aktivnost' sopolimerov novyh strukturnyh tipov // Himiko-farmacevticheskij zhurnal. 2011. T. 45, no. 4. pp. 24–27.

4. Denisov E.T. Radikal'nye reakcii v himii, tehnologii i zhivom organizme. Lekcija 14. Chernogolovka, 2003. pp. 89–101.

5. Inkizhinova C. Jekspertnyj chaj iz Rossii // Jekspert: jelektronnyj zhurnal. 2010, 15 nojabrja. 2010. http://expert.ru/expert/2010/45/ekspertnuy_chay_iz_rossii/.

6. Lesovskaja M.I. Adaptacionnyj potencial nespecificheskoj rezistentnosti zdorovyh ljudej pri razlichnyh funkcional'nyh nagruzkah i sostojanijah organizma: monografija. Krasnojarsk, RIO KGPU, 2003. 248 p.

7. Maslennikov P.V., Chupahina G.N., Skrypnik L.N., Feduraev P.V., Seledcov V.I. Jekolo-gicheskij analiz aktivnosti nakoplenija bioflavonoidov v lekarstvennyh rastenijah // Vestnik Baltijskogo federal'nogo universiteta im. I. Kanta. 2014. Vyp. 7. pp. 110–120.

8. Puhov K.I., Makarskaja G.V., Jahnina E.I., Puhova Ja.I. Hemiljuminescentnyj analiz kinetiki generacii aktivnyh form kisloroda kletkami cel'noj krovi pri vozme-shhaemyh jeksfuzijah krovi // DAN. 1991. T. 316. no. 1.

9. Sharapaeva M.S., Lesovskaja M.I. Baktericidnost' i radikalotropnost' jefirnyh masel sosny, jevkalipta i limona // Vestnik KrasGAU. 2012. no. 2. pp. 290–294.

10. Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F., Munné-Bosch S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? // Trends in Plant Science. 2009. Vol. 14, Issue 3. pp. 125–132.

11. Polishchuk G., Pertsevy F., Prasol D. Investigation of conditions for production of hibiscus extracts / Risk and Efficiency in Economy Practice: Proceedings of the 17th «George Baritiu» University Invernational Conference on control, development and applied informatics in business and economics, Brasov, Romania, November 24–24, 2011 (CDAIBE'11).

Рецензенты:

Мучкина Е.Я., д.б.н., профессор, профессор кафедры экологии и природопользования ИЭУиП ФГАОУ ВПО СФУ, г. Красноярск;

Тарасова О.В., д.с.-х.н., профессор, заведующая отделением экологии, природопользования и географии ИЭУиП ФГАОУ ВПО СФУ, г. Красноярск.

Работа поступила в редакцию 19.02.2015.