

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології

**ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ ХЛОРОГЕНОВОЇ КИСЛОТИ В
РЕГУЛЯЦІЇ АНТИТОКСИЧНОЇ ФУНКЦІЇ ПРИ ОТРУЄННІ
ІОНАМИ МІДІ**

Допущена до захисту

«__» _____ 2023 р.

Кваліфікаційна робота

бакалавра кафедри

Завідувач кафедри

Казакової Маргарити Олексіївни

проф., д.б.н. Божков А.І.

Оцінка «_____»

Голова ЕК _____

Науковий керівник:

«__» _____ 2023 р.

проф., д.б.н. Божков Анатолій

Іванович

Харків 2023

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Дослідження ролі хлорогенової кислоти в регуляції антитоксичної функції при отруєнні іонами міді».

Робота включає: 41 сторінки, 3 таблиці, 4 рисунків; використаних джерел – 26.

Відповідно до мети необхідно вирішити ряд завдань:

1. Надати характеристику і класифікацію поліфенольних з'єднань.
2. Розглянути властивості та ізоформи хлорогенової кислоти.

Природні джерела хлорогенової кислоти.

3. Дослідити методи отримання хлорогенової кислоти з рослинних джерел.

4. Розглянути біологічну дію хлорогенової кислоти, а також дію хлорогенової кислоти на індукований фіброз печінки при отруєнні сірчаною міддю.

Ключові слова: хлорогенова кислота, кофеїнова кислота, поліфенольні з'єднання, вітамін А.

Скорочення:

1. Хлорогенова кислота – ХК
2. Перорально – *per os*.

ANNOTATION

Qualification work on the topic: "Investigation of the role of chlorogenic acid in the regulation of the antitoxic function in poisoning by copper ions."

The work includes: 41 pages, 3 tables, 4 figures; used sources – 26.

According to the goal, it is necessary to solve a number of tasks:

1. To provide the characteristics and classification of polyphenolic compounds.
2. To consider the properties and isoforms of chlorogenic acid. Natural sources of chlorogenic acid.
3. To investigate methods of obtaining chlorogenic acid from plant sources.
4. To consider the biological effect of chlorogenic acid, as well as the effect of chlorogenic acid on induced liver fibrosis.

Key words: *chlorogenic acid, caffeic acid, polyphenol compounds, vitamin A.*

Abbreviation:

1. Chlorogenic acid - CGA
2. Orally - per os.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ	2
ANNOTATION	3
ЗМІСТ	4
ВСТУП	6
Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Характеристика і класифікація поліфенольних з'єднань	8
1.2. Властивості та ізоформи хлорогенової кислоти. Природні джерела хлорогенової кислоти	12
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	14
2.1. Об'єкт дослідження	14
2.1.1. Дія хлорогенової кислоти на Си- індукований фіброз печінки.	14
2.1.2. Вплив хлорогенової кислоти на ендотеліальну функцію та ліпідний метаболізм	14
2.1.2. Компоненти кави як найпопулярнішого продукту у споживанні.	15
2.2. Методи виділення хлорогенової кислоти	17
2.2.2. Ультразвукова екстракція	21
2.2.3. Мікрохвильова екстракція	22
2.2.4. Рідинна екстракція під тиском.	25
2.2.5. Надкритична рідинна екстракція.	25
2.2.6. Ферментативна екстракція.	26
2.2.7. Матрична твердофазна дисперсія	27
2.2.8. Відцентрова розподільна хроматографія	28
2.3. Біологічна дія хлорогенової кислоти	29

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	31
3.1. Вплив хлорогенової кислоти та вітаміну А на кількість та характеристики еритроцитів у тварин на фоні інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю.	31
4.2 Вплив хлорогенової кислоти та вітаміну А на кількість деяких імунокомпетентних клітин у тварин на тлі інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю	34
ВИСНОВКИ	39
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	40

ВСТУП

Хлорогенова кислота - це один з елементів, який людина отримує з продуктів харчування, оскільки не може виробляти його самостійно. Молекулярна формула хлорогенової кислоти має такий вигляд: $C_{16}H_{18}O_9$. Хлорогенова кислота - це сполука рослинного походження, яка складається з кавової та хінної кислоти.

Хлорогенова кислота, яка є однією з основних речовин фенілпропановидного метаболізму, відіграє важливу роль у різних процесах життєдіяльності рослинних і тваринних клітин. У контексті кавової кислоти термін "хлорогенові кислоти" відноситься до продуктів її ефірифікації. Існує багато її ізомерів, але зазвичай виділяються три з них: 3-кофеїлхінна (3-QCA), 4-кофеїлхінна (4-QCA) і 5-кофеїлхінна (5-QCA) кислоти, які зустрічаються на практиці.

Хлорогенова кислота є потужним антиоксидантом, що означає, що вона може допомогти захищати клітини від пошкоджень, спричинених вільними радикалами. Рівень вільних радикалів може спричинити розрив біологічно важливих молекул та, в результаті, появу різних захворювань. Вважається, що окиснювальні процеси є однією з причин недостатності імунологічної системи та збільшеного ризику інфекційних захворювань, розвитку раку, діабету, артриту, ревматоїдного артриту, захворювань дихальних шляхів, катаракти, атеросклерозу та ряду деструктивних процесів, пов'язаних зі старінням.

Кавова кислота, що є складовою хлорогенової кислоти, присутня у каві у формі калієвої солі. Під час гідролізу хлорогенової кислоти, кавова кислота звільняється. Можна припустити, що найбільша активність спостерігається у хлорогенової кислоти, яка міститься в зеленій каві. Саме тому зелена кава недавно активно просувається як напій з антиоксидантною дією.

Мета даної роботи – оцінити морфо-функціональні особливості хлорогенової кислоти в регуляції при отруєнні іонами міді.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні задачі:

1. Оцінити властивості та ізоформи хлорогенової кислоти. Природні джерела однокислотної неорганічної сполуки.
2. Визначити біологічну дію хлорогенової кислоти, а також її вплив на індукований фіброз печінки.
3. Порівняти характеристику і класифікацію різноманітних поліфенольних з'єднань.
6. Проаналізувати біологічну дію хлорогенової кислоти, а також дію хлорогенової кислоти на Си - індукований фіброз печінки.
7. Дослідити вплив хлорогенової кислоти та вітаміну А на кількість деяких імунокомпетентних клітин у тварин на тлі інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю

Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Характеристика і класифікація поліфенольних з'єднань

Поліфенольні сполуки (або поліфеноли) - це клас хімічних сполук, які містять більше одного фенольного кільця. Вони зустрічаються в природі в рослинах, таких як фрукти, овочі, горіхи, зерна, чай та виноградна лоза.

Будова поліфенольних сполук може бути дуже різною, але загальним елементом є наявність двох або більше фенольних груп, які можуть бути з'єднані між собою через різні мостики, такі як ефірні, кетонні або альдегідні зв'язки [1].

Поліфенольні сполуки мають ряд властивостей, які роблять їх цікавими з точки зору біології та медицини. Деякі з цих властивостей включають:

1. Антиоксидантні властивості. Поліфенольні сполуки захищають клітини від пошкоджень, спричинених вільними радикалами. Вони можуть також захищати організм від раку, серцево-судинних та інших захворювань.
2. Антибактеріальні властивості. Деякі поліфенольні сполуки мають антибактеріальну дію, що дозволяє їм боротися з інфекційними захворюваннями, такими як, наприклад, грип.
3. Протизапальні властивості. Багато поліфенольних сполук можна застосовувати для зменшити запалення в організмі та покращення стану людей з хронічними запальними захворюваннями, такими як артрит чи захворювання кишківника.
4. Антигенотоксичні властивості. Поліфенольні сполуки можуть захищати клітини від пошкоджень ДНК, що допомагає знизити

ризик розвитку раку та інших захворювань, пов'язаних зі змінами в ДНК.

5. Антикарієсні властивості. Деякі поліфенольні сполуки можуть бути корисними для захисту зубів від карієсу та інших захворювань ротової порожнини.

6. Антиалергічні властивості. Деякі поліфенольні сполуки допомагають зменшити симптоми алергій та астми, такі як свербіж, набряк та подразнення.

Існує кілька класифікацій поліфенольних сполук, одна з них включає наступні категорії:

Таблиця 1.1

Класифікація поліфенольних сполук (за [2,3]):

Назва	Властивості
Флавоноїди	Один з найбільших класів поліфенольних сполук, які зустрічаються в рослинах. Вони включають кверцетин, рутин, каєцин, епікаєцин, кверцетин-3-глюкозид, нарингенін, кампферол та інші.
Фенольні кислоти	Сполуки, які містять одну або більше карбоксильну групу та фенольний кільцевий залишок. До цього класу належать галічна кислота, кофеїнова кислота, ферулова кислота, синапінова кислота та інші.

Таніни	Високомолекулярні поліфенольні сполуки, які можуть бути катехіновими, елаговими кислотами або галовими кислотами. Таніни зустрічаються в рослинах та мають властивості, що захищають їх від шкідливих впливів зовнішнього середовища.
Стілбени	Гетероциклічні поліфенольні сполуки, які зустрічаються в рослинах. До цього класу належать резвератрол, піктогренол, арахінідін та інші.
Лігнани	Група складних полімерних сполук, які зустрічаються в рослинах та мають важливі біологічні функції. Існують: високомолекулярні лігнани та низькомолекулярні лігніни
Антоціани	Водорозчинні пігменти, які забарвлюють квіти та плоди у фіолетові, сині, червоні та рожеві відтінки. Вони мають потужні антиоксидантні властивості та можуть допомагати знизити ризик розвитку серцево-судинних захворювань.

Класифікація поліфенольних сполук може також бути здійснена згідно з їх хімічною структурою та способом отримання.

Ці фітосполуки мають здатність зв'язувати вільні радикаліони та реакційно здатні метаболіти чужорідних речовин. Тому актуальним є покращення імуномодельовальних властивостей організму шляхом застосування біологічно активних речовин, що входять до складу природних композицій речовин рослинного походження. Серед таких речовин провідне місце належить поліфенольним сполукам, зокрема, флавоноїдам, котрі не синтезуються в організмі людини та мають антиоксидантну дію.

Як відомо, флавоноїди — це природні поліфеноли, що охоплюють близько п'яти тисяч сполук. Ці сполуки об'єднують в одну групу відповідно до їх загальною властивістю – здатністю зміцнювати стінки капілярів (Р – вітамінна залежність). Особливості екстрагування біологічно активних речовин з рослинної сировини зумовлені властивостями рослин, їх клітин і фізико-хімічною спорідненістю екстрагенту й речовин, що витягуються. Доцільним прийомом для одержання біологічно активних речовин із рослинної сировини є метод рівноважного екстрагування. [3]

У сучасному світі є важливим розуміння боротьби зі звільненням вільних радикалів у людському організмі, які спричинюють розвиток захворювань, пов'язаних з окисним стресом. Одним зі способів захисту від вільних радикалів є застосування природних композицій речовин рослинного походження, зокрема, біологічно активних речовин, які містять поліфенольні сполуки. Флавоноїди, які є одним з видів поліфенольних сполук, не синтезуються в організмі людини, але мають антиоксидантну дію. У рослинній сировині біологічно активні речовини можна одержати за допомогою методу рівноважного екстрагування, який залежить від фізико-хімічних властивостей екстрагенту та речовин, що витягуються. Цей метод є доцільним для одержання біологічно активні речовини з рослинної сировини. Застосування таких речовин може покращити імуномодулюючі властивості організму та зміцнити стінки капілярів. [3]

Зважаючи на вищезазначене, важливо звернути увагу на значення раціонального харчування в попередженні та лікуванні хвороб, пов'язаних з окисним стресом. Особливо корисними є продукти з високим вмістом антиоксидантів, таких як фрукти та овочі, зелений чай, кава, кокосова вода, грецький горіх, оливкова олія, а також продукти з вмістом поліфенольних з'єднань, такі як темний шоколад, ягоди, горіхи та інші. Використання біологічно активних сполук з природних джерел може бути ефективним і безпечним підходом до зміцнення імунної системи та запобігання розвитку захворювань, пов'язаних з окисним стресом. [4]

1.2. Властивості та ізоформи хлорогенової кислоти. Природні джерела хлорогенової кислоти

Хлорогенова кислота є поліфенольною сполукою, яка складається з кислотного залишку та ефірної групи, пов'язаної з гідроксильним радикалом на фенольному кільці. Її хімічна формула $C_{16}H_{18}O_9$.

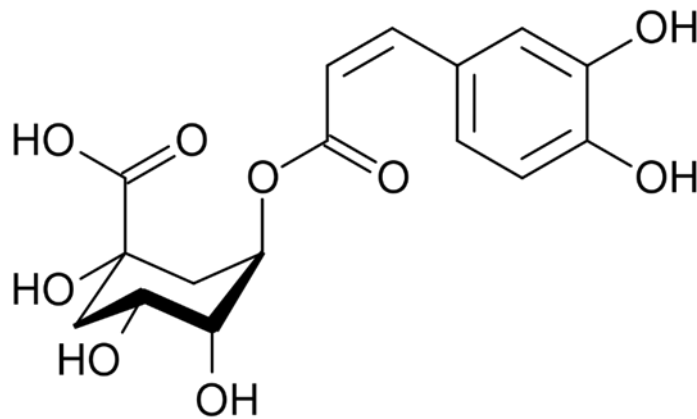


Рис.1.1. Структурна формула поліфенольної сполуки.

Будова хлорогенової кислоти включає дві групи кислот: 3-карбоксихлорогенову кислоту та кумаринову кислоту, які зв'язані між собою за допомогою ефірного зв'язку. Головним фенольним кільцем є кислотне ядро з присутністю двох гідроксильних груп у позиціях 3 та 4, до яких також приєднується кислотний залишок.

Хлорогенова кислота являє собою безбарвні кристали з температурою плавлення 206-210 °С. Легко розчинна у воді та етанолі, важко розчинна у діетиловому ефірі, не розчинна у хлороформі. Лужний розчин зеленіє на повітрі, звідси назва кислоти. Піки УФ-спектру становлять 240, 298 та 325 нм. В УФ-світлі дає блакитну флуоресценцію [4].

Хлорогенова кислота має два основних ізомери: 3-хлорогенову кислоту та 5-хлорогенову кислоту. Ці ізомери відрізняються місцем заміщення хлору на фенольному кільці. 3-хлорогенова кислота має хлор в позиції 3 фенольного кільця, тоді як у 5-хлорогенової кислоти хлор заміщується в позиції 5. [5]

В природі зазвичай зустрічається 5-хлорогенова кислота, яка є основним компонентом кавової кислоти. Ізомери хлорогенової кислоти мають різні фізичні та біологічні властивості. Наприклад, 3-хлорогенова кислота має сильнішу антиоксидантну активність, ніж 5-хлорогенова кислота. Також відомо, що 3-хлорогенова кислота має більшу здатність до зв'язування з метаболітами, що забезпечує її більшу ефективність в організмі. [5]

Хлорогенова кислота є поширеною в рослинному світі. Вона може бути знайдена в різних продуктах, таких як кава, чай, яблука, груші, ягоди, абрикоси, персики, картопля, морква, горох, а також у різних видів зерна, включаючи рис, пшеницю та жито. [6]

Особливо велика кількість хлорогенової кислоти міститься в зеленій, необсмаженій каві. Також хлорогенова кислота є важливою складовою у деяких травах та лікарських рослинах, таких як ехінацея пурпурова та зелений чай. Дану сполуку можна отримати тільки з обмеженої кількості продуктів харчування. [5]

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Об'єкт дослідження

2.1.1. Дія хлорогенової кислоти на Си-індукований фіброз печінки.

Індукований фіброз печінки є станом, при якому нормальні тканини печінки замінюються сполучною тканиною. Це є результатом хронічного запалення, що може бути спричинене багатьма факторами, такими як вживання алкоголю, інфікування вірусом гепатиту, автоімунні захворювання тощо.

При індукованому фіброзі печінки з'являється надмірна кількість колагену, який є складовою частиною сполучної тканини. Хвороба може призвести до зміни форми печінки, зменшення її функції та порушення обміну речовин в організмі. Якщо не лікувати, індукований фіброз печінки може прогресувати до цирозу печінки, що є небезпечним та, в деяких випадках, смертельним станом.

Дослідження показали, що хлорогенова кислота може мати певний позитивний ефект на печінку. Вона має протизапальний ефект і допомагає зменшити запалення в печінці, що може бути корисним при індукованому фіброзі. Крім того, деякі дослідження на тваринах показали, що додавання хлорогенової кислоти до раціону може допомогти зменшити рівень фіброзу в печінці.

Однак, слід зазначити, що більшість досліджень були проведені на тваринах і їхні результати не можуть безпосередньо застосовуватись до людей. Для того, щоб підтвердити корисні властивості хлорогенової кислоти при індукованому фіброзі печінки у людей, потрібні додаткові дослідження. [7]

2.1.2. Вплив хлорогенової кислоти на ендотеліальну функцію та ліпідний метаболізм.

Відомо, що порушення функції ендотелію, яке розвивається при таких захворюваннях, як гіпертонія, діабет, метаболічний

синдром та інші, також може сприяти розвитку атеросклерозу. Однак, хоча механізми кардіоваскулярного захисту поліфенолів, здається, більш добре вивчені, механізми дії на ендотеліальну дисфункцію як основну подію в розвитку атеросклерозу залишаються невідомими. Докази свідчать про те, що це може бути пов'язано з антиоксидантними та протизапальними властивостями хлорогенової кислоти. Інший механізм пов'язаний з захисними ефектами на функцію ендотелію через вивільнення вазоактивних молекул, таких як оксид азоту (NO) та тромбоксан A2 (TXA2).

Дисліпідемія може спричиняти розлади глікометаболізму, пов'язані з ризиком виникнення жирової хвороби печінки та ССС. Визначено, що метаболізм ліпідів та глюкози можна модулювати за допомогою хлорогенової кислоти.

У 2002 року Родрігес де Сотільо та Хедлі досліджували вплив хлорогенової кислоти на глюкозовий та ліпідний профіль у ожирілих, гіперліпідемічних та інсулінорезистентних щурах породи Закера. Було виявлено, що хлорогенова кислота сприяла значному зниженню постпрандіального пікового відгуку на зміни глюкози, але не впливала на стійку гіпоглікемію порівняно з фазою попереднього лікування хлорогеновою кислотою в тій же групі щурів. Вони також встановили, що у щурів, які отримували певне дозування, значно знижувалися рівні холестерину та триацилгліцеролу у плазмі натще, так само як і рівні триацилгліцеролу в печінці. Згодом рійшли до висновку, що в організмі хлорогенова кислота саме пов'язана зі зниженням різних ліпідів у плазмі та печінці та покращеною толерантністю до глюкози. [8]

2.1.2. Компоненти кави як напопулярнішого продукту у споживанні.

Велика частина населення світу розглядає каву як неодмінний елемент своєї повсякденності. В Україні ми спостерігаємо чітку тенденцію до зростання обсягів споживання натуральної кави. Споживання натуральної кави призводить до утворення різних видів відходів, включаючи кавовий

шлак, що містить кавове масло. Розробка технологій та шляхів використання таких відходів є актуальною проблемою нашого часу.

Суха речовина сирії кави складається з наступних основних компонентів у відсотках: кофеїн - 0,7-2,5; білкові речовини - 9-19,2; жир - 9,4-18; сахароза - 4,2-11,8; моносахариди - 0,17-0,65; клітковина - 32,5-33,5; пентозани - 5-7; дубильні речовини - 8,7-11,9; мінеральні речовини - 3,7-4,5; органічні кислоти, зокрема хлорогенова - 4-10,9; лимонна - 0,3; винна - 0,4; яблучна - 0,3; щавлева - 0,05; кавова - 0,2. Вологість сирії кави становить 9-12%.

Кавова олія, що міститься у смаженій каві, є цікавим інгредієнтом, який може бути використаний у харчовій промисловості. Вона має унікальний смак та поживні властивості. Використання кавової олії як інгредієнта має практичну цінність і залежить від її хімічних характеристик і фізичних властивостей. Основними жирними кислотами, присутніми в кавовій олії, є лінолева і пальмітинова кислоти. Крім того, вона також містить значні кількості стеаринової та олеїнової кислот.

Розуміння поведінки фазового переходу кавової олії є критичним для оцінки відповідності її використання як інгредієнта або харчової добавки в процесі виробництва харчових продуктів.

Для того, що оцінювати та вдосконалювати технології з добування хлорогенової кислоти с кофеїнової, потрібно розуміти структуру кавової ягоди. [9-10]

Основні компоненти у структурі кавової ягоди:

1. Зовнішня шкірка або екзокарп - це тонкий захисний шар, що покриває ягоду.
2. М'ясистий шар або мезокарп - це пульпа або м'якоть, яка містить велику кількість вологи і надає ягоді свіжий фруктовий вигляд.
3. Пергамент або ендокарп - це тонка оболонка, що оточує зерно кави і захищає його від зовнішніх факторів.

4. Зерно кави - це насіння, яке знаходиться всередині пергаменту і є основним продуктом, з якого відбувається екстракція під час якої виділяються усі поживні речовини, у тому числі й хлорогенова кислота.

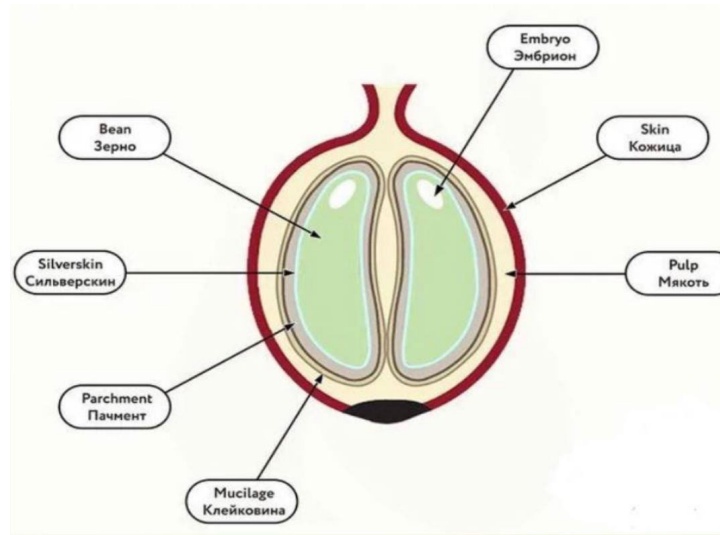


Рис.2.2. Структура кавової ягоди [11]

2.2. Методи виділення хлорогенової кислоти

Останнім часом зріс інтерес до натуральних продуктів, які містять багато хлорогенових кислот. Тому виникла потреба в більш ефективних методах екстракції, які б дозволили отримати екстракти з більш високим вмістом ХК та з меншою кількістю продуктів їх розпаду. Пошук нових та альтернативних методів виділення ХК з рослин додатково підтримується фактом, що деякі з цих сполук можна знайти в природі в дуже низьких концентраціях. Таким чином, для отримання достатньої кількості ХК потрібні дуже ефективні методи виділення, тим більше, що їх структурна різноманітність і складність роблять хімічний синтез нерентабельним.

На жаль, не єдиною проблемою у визначенні ХК в рослинах або рослинних продуктах становить усунення/обмеження деградації/трансформації ХК. Кількість сполук, які необхідно ідентифікувати під час одного аналізу, постійно зростає, хоча кількість

комерційно доступних стандартів обмежена лише кількома. Велика кількість ХК з дуже подібними властивостями та їхня схильність до швидкого утворення продуктів перетворення/деградації під час екстракції ускладнює аналіз ХК у природних зразках. Для розв'язання цієї проблеми все частіше використовують методи, у яких хроматографічні, спектроскопічні чи спектрометричні техніки поєднані з біологічним чи хімічним аналізом, наприклад, методом рідинної хроматографії – мас-спектрометрії. [12]

ХК відносяться до дуже поширених рослинних метаболітів. Вони присутні, наприклад, в яблуках, кісточкових фруктах (персиках, нектаринах, сливах, лічі, манго, вишнях), ягідних фруктах (чорниці, чорносливі, ожині, брусниці), капустяних овочах (білокачанній капусті, брюсельській капусті та кейлі), у моркві, кмині та коріандрі, а також в інших різноманітних овочах, таких як латук та картопля. Незважаючи на їх високу поширеність, вважається, що вони є найбільш характерними компонентами рослин з родини айстрових, таких як артишок (*Cynara scolymus L.*), зміячка іспанська (*Scorzonera hispanica L.*), ехінацея пурпурова (*Echinacea purpurea L. Moench*), деревій звичайний (*Achillea millefolium L.*), розторопша плямиста (*Silybum marianum L. Gaertner*), підбіл звичайний (*Tussilago farfara L.*), пижмо звичайне (*Tanacetum vulgare L.*) та ромашка лікарська (*Matricaria chamomilla L.*).

Проте, навіть якщо ці сполуки властивими для певної родини рослин, вміст ХК дуже різниться навіть у межах виду. Так, загальний вміст ХК в артишоку коливається від 8% сухої речовини в молодих тканинах до менше ніж 1% в старіючих. Із загального вмісту ХК в цій рослині 5-ХК є найбільш представленим окремим компонентом (39% усіх ХК в артишоку), за ним йдуть 1,5-ди-ХК (21%) і 3,4-ди-ХК (11%). Вміст 1,3-ди-ХК становить 1,5% від усіх ХК. У скорцонері ж, навпаки, міститься 180 мг на кг сухої речовини 5-ХК з невеликим вмістом інших похідних ХК або взагалі без них [13].

ХК знаходяться у всіх частинах рослин (насіння, корені, бульби, листя та квітки), а також у різних продуктах, виготовлених з них, зокрема в напоях, таких як кава, зелений та чорний чай, мате, сік, настої та навіть вино. Слід, однак, підкреслити, що якісний і кількісний склад ХК є різноманітним і залежить не тільки від частин рослини, але й від фізіологічного стану рослини, умов зберігання та обробки рослинної сировини, особливо коли вона супроводжується теплом та/або ферментативною обробкою. Також слід пам'ятати про вплив УФ-випромінювання. Хоча в рослинах зустрічаються переважно транс-ізомери хлорогенових кислот, цис-ізомери ХК утворюються під дією УФ-випромінювання. [13]

Сучасні методи, що використовуються для визначення сполук у рослинах і продуктах їхньої переробки, являють собою двоетапні процеси. На першій стадії сполуки екстрагуються із попередньо підготовленого зразка. На другій вони безпосередньо аналізуються, здебільшого за допомогою хроматографічних методів. Залежно від типу зразка застосовуються різні процедури для його попередньої обробки. Тверді зразки, такі як рослини та тверді харчові продукти, зазвичай гомогенізують, чому може передувати ліофілізація або заморожування рідким азотом. Рідкі зразки, такі як напої, зазвичай спочатку фільтрують та/або центрифугують, а потім піддають прямому аналізу або, що є більш поширеним, додатково обробляють для підвищення селективності визначення. [14]

Для найбільш повного виділення сполук зі зразків, та/або для їх концентрації в даний час використовується широкий спектр методів підготовки зразків (наприклад, дистиляція, сублімація, екстракція до газової, рідкої або твердої фази). Більшість технік аналізу рослинних компонентів включають застосування методів рідинної екстракції, таких як екстракція в апараті Сокслета зі зворотним охолодженням і мацерацією.

Це так звані конвенційні методи рідинної екстракції. Їхня екстракційна здатність ґрунтується на екстракційній здатності різних розчинників і використанні тепла та/або перемішування. Конвенційні методи мають ряд недоліків, наприклад, тривалість у часі, відносно висока витрата розчинника, часто незадовільна відтворюваність і неповна екстракція полярних речовин. З метою подолати недоліки конвенційної рідинної екстракції та оптимізувати її процес, зробити його більш безпечним для навколишнього середовища, було розроблено і впроваджено інноваційні методи екстракції, такі як екстракція за допомогою мікрохвиль, ультразвуку, тиску, ферментів, а також надкритичних рідин. Спектр їх застосування для екстракції різних рослинних компонентів, включаючи ХК, є дуже широким, і дедалі більше використовується як у малих (лабораторія), так і у великих (виробництво) масштабах [14].

Ці методи, мінімізуючи використання здебільшого токсичних органічних розчинників, можуть додатково покращити якість екстрактів, що важливо, беручи до уваги використання ХК як добавок до харчових та функціональних продуктів. З іншого боку, для належного дослідження складу рослин дедалі частіше рекомендуються методи матричної твердофазної дисперсії (MSPD) та її різновид, метод подрібнення морським піском (SSDM).

Це пов'язано з тим, що вони не викликають жодних процесів трансформації та/або деградації в досліджуваних речовинах і, як наслідок, дозволяють встановити справжню концентрацію окремих ХК у досліджуваних рослинах і визначити, які похідні хлорогенових кислот є нативними рослинними компонентами і рівень їхньої концентрації. Іншими словами, застосування MSPD/SSDM в аналізі рослинних речовин дозволяє уникати помилок, які можуть виникнути при дослідженні хлорогенових кислот та похідних рослинних метаболітів.

2.2.2. Ультразвукова екстракція. Механізм дії ультразвуку в рідинах заснований на механічному ефекті, спричиненому імпульсією кавітаційних бульбашок, що створює макротурбулентність, високошвидкісні зіткнення між частинками та збурення в мікропористих частинках природних матеріалів, що прискорює дифузію. Завдяки можливості використання цих феноменів для скорочення часу екстракції та збільшення виходу термолабільних сполук при нижчих температурах обробки спостерігається зростаючий інтерес до застосування ультразвуку для екстракції рослинних компонентів. Крім того, техніка ультразвукової екстракції органічними розчинниками (UASE) дає більше можливостей для підвищення екстракційної здатності методу. Окрім ретельного вибору відповідного розчинника, характерного для конвенційних технік, процес можна додатково оптимізувати, і це є важливою частиною процесу UASE. Для оптимізації враховуються частота ультразвуку, амплітуда, кількість застосованих циклів екстракції, час експозиції та номінальна вихідна потужність.

Варто зазначити, що на додаток до низької загальної температури процесу, використання високочастотної ультразвукової обробки також зменшує деградацію екстрагованих сполук. Ще одна суттєва перевага UASE - це вартість обладнання, необхідного для техніки. Вона є невисокою, так як процес найчастіше проводиться в ультразвукових ваннах, які є в кожній лабораторії. Але процес можна реалізувати по-іншому, використовуючи ультразвуковий дезінтегратор. У цьому випадку наконечник, що випромінює ультразвук, безпосередньо занурюється в екстракційну суміш, і процес називається екстракцією розчинником за допомогою сфокусованого ультразвуку (FUASE). Деякі дослідники вважають FUASE ще більш відтворюваним і швидшим, головним чином завдяки в кілька разів більшій потужності ультразвуку. Слід підкреслити, однак, що незалежно від способу екстракції, обидва варіанти можуть генерувати активні форми кисню, що можуть спричинити деградацію

деяких сполук та призвести до зниження їх концентрації в екстрактах, якщо обробка ультразвуком є тривалою.

Отже, важливим питанням при використанні ультразвуку для екстракції рослинних метаболітів є застосування водно-спиртових сумішей як екстрагентів. Це зменшує утворення окисників у результаті розкладання води, оскільки спирти набагато стабільніші стосовно гомолітичного розщеплення [15].

Дослідили, що ультразвуковий метод екстракції 5-ХК зі свіжого листа евкомії (*Eucommia ulmoides* Oliv.). У ході експериментів аналізували вплив чотирьох змінних - тип розчинника, його об'єм і концентрація, а також час екстракції - на вихід 5-ХК.

Було тестовано воду, метанол, етанол та ізопропанол як розчинники, і було виявлено, що середня ефективність екстракції 5-ХК зменшується в порядку:

Метанол > Етанол > Вода > Ізопропанол

Додавання води до метанолу (70% метанолу у воді, об./об.) додатково збільшує вихід 5-ХК. Підвищення ефективності екстракції також спостерігалось зі збільшенням відношення об'єму розчинника до зразка (співвідношення 1:20 було оптимальним) і кількості циклів екстракції. Було доведено, що, порівняно зі звичайними методами екстракції, трикратна екстракція 5-ХК протягом 30 хвилин з використанням щоразу свіжого екстрагенту показує найвищий вихід 5-ХК. Оптимізований процес UASE був застосований дослідниками для екстракції 5-ХК з кори *E. ulmoides* та чотирьох інших рослин традиційної китайської медицини. Було встановлено, що незалежно від типу рослинного зразка ефективність UASE є дуже високою, а отримані результати мають високу відтворюваність. [15]

2.2.3. Мікрохвильова екстракція. Екстракцію розчинником за допомогою мікрохвиль (MASE) розглядають як новий і альтернативний метод виділення ХК з рослин і супутніх продуктів за допомогою нагріву

мікрохвилями. Принцип мікрохвильового нагрівання, на відміну від звичайного нагрівання, заснований на прямому поглинанні мікрохвильової енергії та її перетворенні в теплову енергію під час проходження мікрохвиль через середовище. Перетворення електромагнітної енергії в тепло відбувається за допомогою двох механізмів, зокрема, шляхом обертання диполя та іонної провідності, тобто за допомогою інверсії диполів і переміщення заряджених іонів, присутніх як у зразку, так і в розчиннику. Ці два механізми зазвичай відбуваються одночасно, що ефективно перетворює мікрохвильову енергію в теплову. Обертання диполя відбувається, коли молекули диполя намагаються слідувати за електричним полем в тому ж напрямку. Індуковані коливання призводять до зіткнень між диполями та навколишніми молекулами і таким чином створюють тепло. Іонна провідність відноситься до міграції іонів під впливом електричного поля, що створюється мікрохвилями. У цьому випадку тепло утворюється через опір середовища потоку іонів. Слід додати, що в обох механізмах вироблена теплова енергія негайно перерозподіляється в середовищі, що призводить до однорідного нагрівання середовища. [16]

На ефективність MASE може впливати велика кількість факторів, таких як частота та потужність мікрохвиль, тривалість мікрохвильового випромінювання, вміст вологи та розмір частинок зразків рослин, тип і концентрація розчинника, співвідношення твердої речовини до рідини, температура екстракції та кількість циклів екстракції. Серед цих факторів розчинник вважається одним із найважливіших параметрів, який впливає не лише на розчинність сполук, але й на поглинання енергії мікрохвиль. Чим вище діелектрична проникність і діелектричні втрати, тим вище здатність розчинника поглинати мікрохвильову енергію і тим швидше розчинник нагрівається. Однак слід додати, що в MASE можна використовувати як полярні, так і неполярні розчинники. Крім того, комбінуючи розчинники, що відрізняються за своєю діелектричною

проникністю, можна змінювати властивості екстрагента та його селективність. Тим не менш, вміст води в екстрагованій речовині та/або в розчиннику значно впливає на вихід екстракції. Таким чином, виділення сполук із рослин можна проводити без використання органічних екстрагентів, у так званому безрозчинниковому режимі. Іншими перевагами MASE є покращена ефективність та скорочений час екстракції, що приводить до зниження витрат та впливу на навколишнє середовище. Завдяки цим вагомим перевагам MASE вважається хорошою альтернативою традиційним процесам екстракції рослинних метаболітів. Суттєвою перешкодою при використанні MASE для виділення ХК може бути факт, що кількість мікрохвильової енергії, що генерується в системі, іноді може бути настільки високою, що легко може спричинити втрату термічно нестабільних сполук і, як наслідок, зниження ефективності їх екстракції. Однак наведені нижче приклади показують, що успішно проведений процес екстракції ХК за допомогою MASE з використанням відповідного об'єму води за кілька коротких циклів екстракції може дати більший вихід ХК порівняно зі звичайними методами екстракції. [16]

Використання MASE для екстракції ХК із зелених кавових зерен було описане в [17]. Було перевірено вплив чотирьох змінних - тип розчинника, час екстракції, температура екстракції та потужність мікрохвиль - на ефективність екстракції 5-ХК. Серед досліджених розчинників (етанол, метанол і вода) вода виявилася найкращим екстрагентом, що забезпечує найвищий вихід 5-ХК. Це пов'язано з тим, що діелектрична проникність і полярність води вище, ніж у спиртів. Було помічено, що збільшення часу екстракції з 2 до 5 хв привело до підвищення ефективності екстракції. Однак подальше збільшення тривалості експозиції призвело до зниження виходу 5-ХК. Враховуючи вплив температури екстракції на загальний вихід ХК, було показано, що найбільший вихід був отриманий при температурі 50 °С. Нарешті, перевіряючи вплив мікрохвильової потужності, було помічено, що

загальний вихід ХК збільшувався зі збільшенням мікрохвильової потужності до 800 Вт. Порівнюючи результати MASE з результатами конвенційних методів екстракції, автори дійшли висновку, що оптимізована процедура MASE виділяє 5-ХК настільки ж ефективно, як і звичайні методики. Водночас автори підкреслили, що застосування MASE зменшило як час обробки, так і витрату розчинника. Тому MASE можна визнати більш екологічно чистим методом, що дозволяє одержувати високоякісні екстракти з високим вмістом ХК. [17]

2.2.4. Рідинна екстракція під тиском. Рідинна екстракція під тиском (PLE) відома під різними назвами, наприклад, прискорена екстракція розчинником (ASE), екстракція розчинником під тиском (PSE), екстракція гарячою водою під тиском (PHWE), екстракція субкритичною водою або екстракція перегрітою водою. (SWE).

Метод набув популярності завдяки меншому використанню органічних розчинників і навіть їх повному виключенню, а також значно меншому часу екстракції, необхідному для повного виділення біоактивних сполук із рослин. Ці причини також пояснюють, чому його описують як «зелену» техніку екстракції. За методикою PLE зразок поміщується в екстракційну ємність з нержавіючої сталі та екстрагується в інертній атмосфері розчинником під високим тиском і при температурі, що перевищує температуру кипіння розчинника за атмосферного тиску.

Завдяки збільшенню розчинності та масообміну, а також зменшенню в'язкості та поверхневого натягу розчинників, спостерігаються вищі виходи цільового продукту порівняно з традиційними методами екстракції. Методика виявилася еквівалентною або кращою альтернативою екстракції різних аналітів з різних зразків [18].

2.2.5. Надкритична рідинна екстракція. Надкритична рідинна екстракція (SFE) все частіше використовується в багатьох галузях промисловості, включаючи харчову (декофеїнізація кави), фармацевтичну (екстракція фармакологічно активних речовин), косметику (отримання

ефірних масел) та паливну індустрію. Це пов'язано з тим, що отримані екстракти не містять жодних неорганічних сполук.

Відносно низька температура процесу не спричиняє деградації білків, вітамінів та інших активних інгредієнтів і, таким чином, не знижує їхню біологічну активність та органолептичну якість. Крім того, весь процес проходить в анаеробних умовах, тому продукт не зазнає окислення. SFE має кілька переваг перед звичайними методами екстракції: це гнучкий процес завдяки можливості регулювання потоку розчинника або селективності надкритичної рідини (SCF), він дозволяє уникнути контамінації органічних розчинників та усуває вартісну пост-обробку екстракту для відновлення розчинника.

Надкритичні речовини утворюються за умов, коли температура і тиск перевищують критичну точку, утворюючи гомогенну фазу з як рідинними, так і газоподібними властивостями. Завдяки низькій в'язкості, подібній до газу, і високому коефіцієнту дифузії, надкритична рідина, якщо її використовувати як розчинник, може легко проникати в рослинні матеріали з високою швидкістю масообміну. Крім того, її щільність можна змінювати, регулюючи тиск і температуру. Найбільш часто використовуваним розчинником у SFE є діоксид вуглецю (CO₂) у його надкритичному рідкому стані через наступні фактори: він легкодоступний, це газ, який можна багаторазово використовувати, і він має низьку критичну температуру 31,1 °C і відносно низький критичний тиск 72,8 бар [19]. SFE, завдяки хімічному характеру надкритичного CO₂, є методом, який зазвичай використовується для вилучення неполярних фармакологічно активних сполук із рослин. Для виділення полярних сполук SCF слід збагачувати відповідним полярним розчинником (так званим співрозчинником). Ефект співрозчинника пов'язаний із зміною сил міжмолекулярних взаємодій і збільшенням густини екстрагентів. [20]

2.2.6. Ферментативна екстракція. Останнім часом ферментативна екстракція набула значного інтересу в зв'язку з тим, що метод повністю

екологічний, а одержуваний екстракт має високу якість, що дозволяє використовувати його для виробництва ліків, БАДів та спеціалізованої косметики. Основний принцип цього методу полягає в тому, що ферменти гідролізують клітинну стінку рослин і повністю руйнують її в оптимальних експериментальних умовах, вивільняючи її компоненти. Однак цей метод не позбавлений недоліків, і головною проблемою є підбір відповідного ферменту, який дозволить виділити потрібну сполуку. Крім того, активність ферментів строго залежить від температури і рН середовища, тому ці параметри необхідно постійно контролювати. [21]

Прикладом використання ферментативного методу для виділення ХК з природних матеріалів є виділення хлорогенової кислоти з м'якоті ягід кави. Після кількох годин перемішування м'якоті кави з ферментами (у темряві, при 40 °С) хлорогенову кислоту можна ефективно відокремити від відходів за допомогою невеликої кількості етилацетату [22].

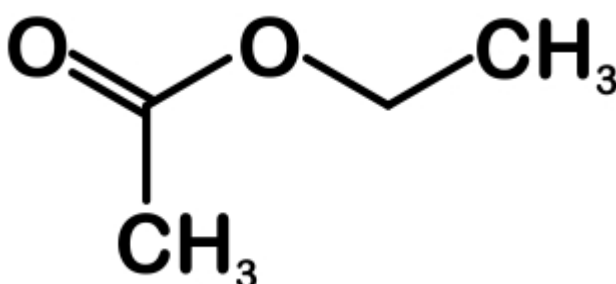


Рис.2.2. Структурна формула етилацетату [22]

2.2.7. Матрична твердофазна дисперсія. Як було зазначено раніше, для прискорення виділення ХК з рослинного матеріалу зазвичай застосовують підвищену температуру. Проте навіть за короткочасної обробки 5-ХК зазнає деградації та трансформації в інші сполуки, які можуть помилково розглядатися як нові рослинні компоненти або можуть призвести до помилкової кількісної оцінки складу рослини. Таким чином, завдання аналізу ХК в рослинах полягає в тому, щоб отримати екстракт, склад якого точно відображав би справжній склад і концентрацію ХК. Так як температура є основним фактором, відповідальним за деградацію ХК,

доцільно використовувати методи екстракції при температурі навколишнього середовища. Одним із таких методів може бути матрична твердофазна дисперсія (MSPD). Крім того, це дуже простий, швидкий і дешевий метод. Ще важливіше, було доведено, що цей метод дозволяє ефективно виділяти різні сполуки з різних типів рослинних зразків. [23]

Принцип MSPD полягає в прямому механічному змішуванні біологічного зразка з твердим матеріалом, наприклад, октадецил-силіцієм (C18), який допомагає руйнувати рослинні клітини. Після кількох хвилин інтенсивної гомогенізації подрібнений рослинний матеріал переносять у пробірку, а вивільнені рослинні компоненти елюють відповідним елюентом. Замість сорбенту C18 в процесі MSPD можна використовувати пісок. У цьому випадку він називається методом руйнування морським піском (SSDM). Є багато прикладів технік, у яких цей метод успішно застосовується для вивільнення різних сполук з різних рослинних матриць, включаючи ХК. Крім того, є приклади, які доводять, що об'єм сполук, отриманих цим методом, є вищим, ніж з використанням традиційних методів [12].

2.2.8. Відцентрова розподільна хроматографія. Однією з типових проблем кількісного аналізу ХК в рослинах і рослинних продуктах є дуже обмежена кількість комерційно доступних стандартів цих сполук. Крім того, деякі комерційні стандарти неправильно описані на рівні регіономерів. Тому, щоб подолати цю проблему без шкоди для якості результатів, зазвичай використовують два підходи. Відповідно до першого використовують сурогатні стандарти, такі як екстракт зеленої кави або артишоку, характеризовані методом рідинної хроматографії - мас-спектрометрії (РХ-МС). Відповідно до другого сполуки виділяють із рослинних екстрактів за допомогою різних хроматографічних технік, а потім піддають ретельному очищенню [21].

За останні декілька років було досягнуто низки вдосконалень у методах виділення та аналізу ХК з різних природних зразків. Застосування

нових, швидших, ефективніших і складніших методів екстракції, таких як UASE, MASE, SFE або PLE, значно підвищило вихід ХК зі значним зниженням використання органічних розчинників. Загальна якість екстрактів також була покращена. Крім того, це привело до зменшення помилок маніпуляцій і, як наслідок, до покращення відтворюваності та повторюваності аналітичних методів.

Не існує офіційних і загальноприйнятих методів аналізу ХК в рослинах і рослинних продуктах. Велика кількість сполук, що належать до родини ХК, і той факт, що ці методи повинні бути застосовані до багатьох різних рослин, ще більше ускладнюють це питання. Тим не менш, сьогодні можна виділити два основних аналітичних методи, які зазвичай застосовуються для аналітичного розділення ХК. Це капілярний електрофорез і рідинна хроматографія. Остання, особливо в поєднанні з тандемом MS/MS, можна навіть вважати технікою, яка займає лідируючу позицію для аналізу сполук, що належать до родини ХК. Це твердження підтверджується тим фактом, що нещодавно розроблені протоколи РХ-МС, засновані на визначенні тих самих іонів-фрагментів, що належать до схожих структур сполук, що утворюють родину (так звані шаблони фрагментації), значно полегшили ідентифікацію ХК без необхідності виділяти чисті сполуки [21].

2.3. Біологічна дія хлорогенової кислоти

Хлорогенова кислота має багато корисних біологічних властивостей та може мати позитивний вплив на здоров'я. Хлорогенова кислота є потужним антиоксидантом, що має багато корисних властивостей для організму людини. Вона захищає клітини та тканини від пошкоджень, спричинених вільними радикалами, які можуть виникати в результаті метаболізму, а також внаслідок зовнішніх факторів, таких як вплив ультрафіолетового випромінювання, забруднення повітря та куріння.

Дослідження підтверджують корисні властивості хлорогенової кислоти для здоров'я. Дж. Лі з колегами встановили, що вживання хлорогенової кислоти може підвищити рівень антиоксидантів у крові та захистити організм від окислювального стресу [22].

Хлорогенова кислота є біологічно активною сполукою, яка має протизапальні властивості та може допомогти у зменшенні запалень та болю в організмі. Дослідження показують, що дана сполука зменшує вироблення протизапальних цитокінів, таких як інтерлейкін-6 (IL-6) та інтерлейкін-1 β (IL-1 β) в клітинах людських макрофагів [21].

Також було виявлено, що хлорогенова кислота зменшує вироблення протизапальних медіаторів, таких як інтерлейкін-8 (IL-8) та фактор некрозу пухлин- α (TNF- α) в клітинах людських ендотеліюму.

Хлорогенова кислота може покращувати здоров'я серця та кровоносних судин. Дослідження проведені на тваринах та людях показують, що хлорогенова кислота може знижувати рівень LDL-холестерину та тригліцеридів, а також підвищувати рівень HDL-холестерину у крові. Наприклад, в дослідженні, Т. Бакурадзе, було показано, що хлорогенова кислота покращує ліпідний профіль у тварин [22].

Крім того, хлорогенова кислота може покращувати еластичність судин та знижувати кров'яний тиск, що є важливими факторами здоров'я серця та кровоносних судин.

За допомогою хлорогенової кислоти можна контролювати рівень цукру в крові та покращувати інсулінову чутливість. Дослідження, проведені в 2017 році, показали, що хлорогенова кислота знижує глікемію і підвищує інсулінову чутливість у людей з ожирінням та діабетом 2 типу [23].

Таким чином, включення продуктів, що містять хлорогенову кислоту, у раціон може мати позитивний вплив на здоров'я людини.

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив хлорогенової кислоти та вітаміну А на кількість та характеристики еритроцитів у тварин на фоні інтоксикації організму сірчаноокислою міддю.

Під час певних дослідів, зроблених в лабораторних умовах, було визначено, що у групі інтактних щурів (тих, що не піддавались дослідам) вміст еритроцитів становило $8,5-9,0 \cdot 10^{12}$ /л, обсяг еритроцитів становив 52,6 фл, гематокрит 47,7%, анізоцитоз (ширина розподілу) 11,9%, середній вміст гемоглобіну 315,3 г/л. Вважають, що ці дані є входять у нормативні межі здорового щура, тобто є референтними значеннями. У таблиці 3.1 наведені середні значення з 5 експериментів разом зі стандартними похибками; позначені варіанти, для яких значення Р менше 0,05 в порівнянні з контрольним варіантом.

Таблиця 3.1

Зміст та деякі характеристики еритроцитів у різних експериментальних груп тварин

Групи	Кількість еритроцитів, 10^{12} / л	Об'єм еритроцитів, фл	Гематокрит, %	Анізоцитоз, %	Концентрація гемоглобіну в еритроцитах, г/л
I. Інтактна	8.5 ± 0.30	52.6 ± 0.31	47.7 ± 1.40	11.9 ± 0.68	315.3 ± 8.35
II. Інтоксикація	8.0 ± 0.34	56.3 ± 3.26	44.9 ± 0.35	14.8 ± 1.04 *	313.7 ± 4.06
III. Інтоксикація & ретинол	6.7 ± 0.49 *	61.4 ± 1.60 *	41.0 ± 2.23	18.0 ± 1.13 *	300.3 ± 3.84

IV. Інтоксикація & ХГ per os	7.1 ±0.38*	58.7 ±3.55	41.1 ±1.12	16.5 ±1.37*	306.7 ±6.06
V. Інтоксикація & ХГ IP	6.8 ±0.17*	59.9 ±1.71*	40.9 ±1.65 *	17.4 ±1.01*	305.7 ±2.33

Аналізуючи таблицю 3.1, зрозуміло, що інтоксикація організму іонами міді не мала істотного впливу на кількість еритроцитів та їх характеристики порівняно з контролем, за винятком анізоцитозу, який був збільшений на 24 %. Це вказує на збільшення кількості еритроцитів не стандартного розміру і як правило це первинна ознака початку розвитку анемії. Як відомо, індукція анемії може бути обумовлена багатьма причинами. Основні з них такі:

1. Залізодефіцитна анемія: найпоширеніша форма анемії, що виникає із-за недостатнього рівня заліза в організмі. Це може бути спричинене неправильним харчуванням, недостатнім споживанням заліза, поганою його всмоктуваністю або втратою крові.
2. Вітамін В12-дефіцитна анемія: викликається недостатнім засвоєнням вітаміну В12 в організмі, що може бути пов'язане зі зниженням вироблення фактору внутрішньої каскадної секреції шлунка.
3. Анемія внаслідок хронічних захворювань, таких як рак, хронічні запальні захворювання (наприклад, ревматоїдний артрит), а також захворювання нирок та печінки можуть спричинити анемію.
4. Гемолітична анемія: виникає через прискорену руйнівну дію еритроцитів. Це може бути спричинено аутоімунними порушеннями, генетичними аномаліями, інфекціями або токсичними речовинами.
5. Генетичні анемії, такі як гемофілія, фанконієва анемія, сфероцитоз та інші.

Триденне введення вітаміну А в дозі 300 МО/100 г маси тіла тваринам після інтоксикації супроводжувалося збільшенням обсягу еритроцитів на 16% порівняно з контролем, зменшенням загальної кількості еритроцитів на 22%, анізоцитоз у цій групі тварин був збільшений на 50% (табл. 3.1). Отже, збільшення вмісту вітаміну А у тварин після інтоксикації не усувало, а навпаки посилювало зміну еритроциту, які можуть бути класифіковані як прояв анемії.

Якщо експериментальним тваринам після інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю і як наслідок розвитку Сі – індукованого фіброзу печінки, вводили хлорогенову кислоту *per os* то спостерігали невелике зменшення кількості еритроцитів (17%), гематокрит залишався на рівні контролю, а анізоцитоз був збільшений на 38%, кількість гемоглобіну не відрізнялися від його вмісту у тварин контрольної групи (табл. 3.1). Було встановлено, що тварини, які отримували хлорогенову кислоту перорально, мали менші зміни в системі еритроциту (кількість та характеристики еритроцитів) порівняно з тваринами, які отримували вітамін А. Однак, коли тваринам з фіброзом печінки вводили хлорогенову кислоту внутрішньочеревно, спостерігалася зменшення кількості еритроцитів на 20%, збільшення анізоцитозу на 46% порівняно зі здоровими тваринами, а рівень гематокриту був нижчим на 15% в порівнянні з контрольною групою з нормальним обсягом еритроцитів. (табл. 3).

Показано, що різні способи введення хлорогенової кислоти в організм мали різні ефекти на показники еритроциту у тварин із Сі-індукованим фіброзом печінки. Так, після внутрішньочеревного введення в організм ХК виявлялися глибші та системні зміни показники еритроцитів порівняно із введенням ХК *per os* і ці зміни були подібні до дії викликаних дією вітаміном А.

Можна зробити припущення, що спостережені зміни у показниках еритроцитів після введення тваринам вітаміну А та особливо після

внутрішньочеревного введення хлорогенової кислоти можуть бути наслідком пригнічення функцій печінки та/або змін у функціонуванні імунної системи, зокрема клітинної ланки.

4.2 Вплив хлорогенової кислоти та вітаміну А на кількість деяких імунокомпетентних клітин у тварин на тлі інтоксикації організму сірчаноокислою міддю

Як було показано раніше, інтоксикація організму сірчаноокислою міддю супроводжувалася активацією імунної відповіді, про що можуть свідчити дані щодо збільшення кількості інкорпорованих клітин крові у збільшену капсулу Гліссона печінки у тварин після інтоксикації.

Вміст лейкоцитів у крові інтактних контрольних тварин становив $9,8 \pm 0,75 \times 10^9$ / л, а інтоксикація організму сірчаноокислою міддю супроводжувалася їх збільшенням на 74% порівняно з контролем. У таблиці 3.2 (у кожній групі було по 5 тварин), представлені середні значення у групі та стандартні хибні значення. Відмічені варіанти для яких $P < 0.05$ в порівнянні з контрольною групою. Ці дані підтверджують активацію імунної відповіді тварин після інтоксикації сірчаноокислою міддю.

Таблиця 3.2

Кількість імунокомпетентних клітин у крові різних експериментальних груп тварин

Групи тварин	Лейкоцити, 10^9 / л	Гранулоцити, 10^9 / л	Лімфоцити, 10^9 / L	Моноцити, 10^9 / L
I. Інтактні	9.80 ± 0.75	3.70 ± 0.36	5.70 ± 0.42	0.40 ± 0.10
II. Інтоксикація	$17.07 \pm 1.41^*$	$8.60 \pm 1.47^*$	$7.27 \pm 1.07^*$	$1.13 \pm 0.26^*$

III. Інтоксикація & ретинол	17 . 10±3 . 85*	9 . 4 0 ± 2 . 4 0 *	6 . 63 ± 2 . 04	1 . 07±0 . 13*
IV. Інтоксикація & ХГ per os	10 . 90±3 . 29	4 . 6 0 ± 1 . 6 0	5 . 57 ± 1 . 62	0 . 70±0 . 29*
V. Інтоксикація & ХГ IP	13 . 90±2 . 95*	7 . 17±0 . 99*	5 . 30±1 . 51	1.43±0 . 55*

Введення вітаміну А тваринам на тлі інтоксикації не впливало на вміст лейкоцитів у порівнянні з групою тварин з інтоксикацією та їх кількість залишалася на 74% більше за контрольні значення (табл. 3).

Після введення тваринам на тлі інтоксикації сірчаною кислотою ХГ перорально, спостерігалось відновлення кількості лейкоцитів до рівня контрольної групи. Але після внутрішньочеревного введення хлорогенової кислоти вміст лейкоцитів зменшувався на 20% порівняно з тваринами після інтоксикації, але залишався на 41% вище контрольних значень. (табл.3.2)

Лейкоцити є дуже різноманітною популяцією клітин, і різні типи клітин виконують різні функції у формуванні запальних та імунних процесів в організмі, такі як захист від інфекцій, фагоцитоз, виробництво антитіл. У наступному етапі дослідження було виміряно кількість лімфоцитів, гранулоцитів (нейтрофілів, базофілів та еозинофілів) та моноцитів у різних групах тварин.

Кількість лімфоцитів збільшувалася лише на 26% порівняно з контрольною групою після інтоксикації. Введення тваринам вітаміну А або хлорогенової кислоти як перорально, так і внутрішньочеревно, не мало впливу на кількість лімфоцитів.

Визначення гранулоцитів у експериментальних тварин показало, що їх кількість збільшувалася після інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю більш ніж удвічі порівняно з контролем (табл.3.2), а введення

тварин вітаміну А після інтоксикації не чинило значного впливу на їх кількість порівняно з інтоксикацією (табл. 3.2).

У той же час введення хлорогенової кислоти *per os* тваринам на тлі інтоксикації наводило їх кількість до рівня норми, тоді як ГК після введення внутрішньочеревно не впливало на цей показник, і він залишався вищим за контрольні значення на 93% (табл. 3.2).

Моноцити були найбільш зміненою імунокомпетентною клітиною у досліджуваних групах тварин. Після інтоксикації їх кількість збільшилася в 2,8 рази порівняно з контрольною групою. Введення вітаміну А тваринам на тлі інтоксикації міддю не впливало на кількість моноцитів у крові, і вона залишалася збільшеною в 2,6 рази порівняно з контролем.

Хлорогенова кислота, введена перорально, призводила до зменшення моноцитів на 39% порівняно з інтоксикацією, але їх кількість залишалася 1,7 рази вищою, ніж у контрольній групі. Якщо тваринам після інтоксикації вводили хлорогенову кислоту внутрішньоочеревно, то їх кількість моноцитів залишалася на такому ж підвищеному рівні, як після інтоксикації міддю.

Отже, найбільший ефект на зменшення кількості моноцитів впливав на хлорогенову кислоту якщо вона вводилася *per os*.

Варто зазначити, що важливим фактором є не лише кількість імунокомпетентних клітин, але й співвідношення між різними морфологічними типами цих клітин у досліджуваних групах тварин. Це тому, що ці клітини взаємодіють і утворюють єдину клітинну систему імунітету.

Наприклад, різні типи лейкоцитів, такі як лімфоцити, гранулоцити (нейтрофіли, базофіли та еозинофіли) та моноцити, виконують різні функції у формуванні запальних та імунних процесів в організмі. Співвідношення між цими клітинами може впливати на загальну ефективність імунної відповіді та розвиток запальних станів.

Виявилося, що співвідношення між досліджуваними типами клітин, яке оцінювали за їх збільшенням у порівнянні з контрольним рівнем, відрізнялося у тварин, які отримували ХК на тлі інтоксикації від тварин після інтоксикації (рис.5). Можна стверджувати, що введення ХК тваринам із СІ-індукованим фіброзом печінки супроводжувалося формуванням нових патернів імунокомпетентних клітин, які були близькі до інтактних тварин, якщо ХК вводилася *per os* .

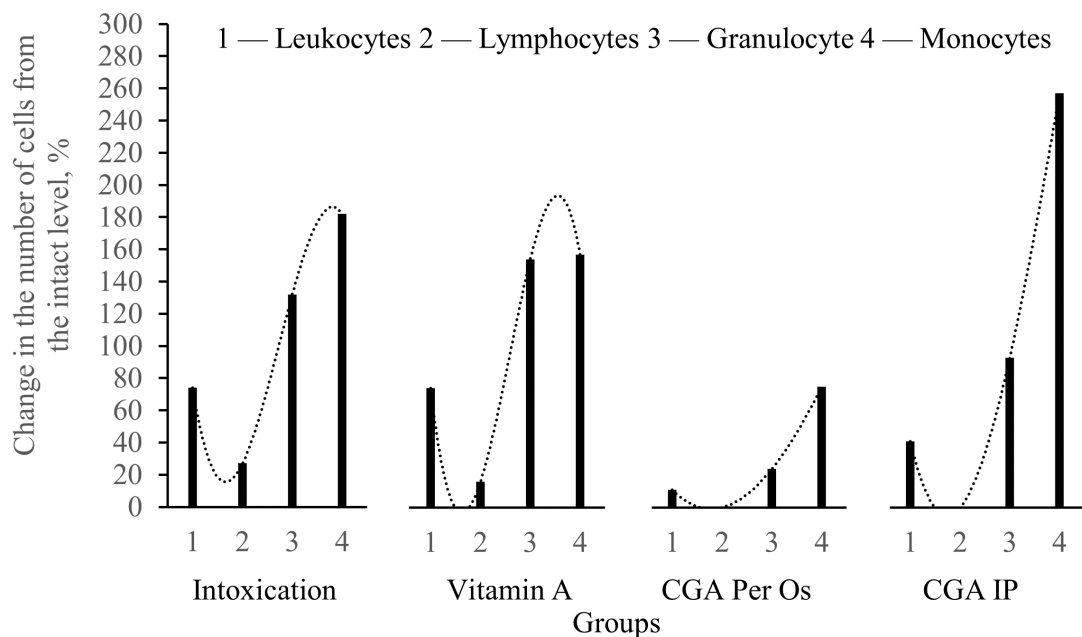


Рис.3.1 - Паттерни, які формували імунокомпетентні клітини (лейкоцитів , лімфоцитів, гранулоцитів та моноцитів) у тварин різних експериментальних груп, які оцінювали зі збільшенням відповідних типів клітин порівняно з інтактним контролем прийнятим за базовий рівень.

Ці результати дозволяють припускати, що дія хлорогенової кислоти відрізняється від дії вітаміну А на лімфопоез і вона виявлялася по-різному залежно від способу введення ГК в організм.

Опираючись на дослідження, зроблено висновки, що введення вітаміну А тваринам після інтоксикації сірчаною міддю не впливало

на кількість і патерн імунокомпетентних клітин. Однак, введення тварин після інтоксикації хлорогенової кислоти перорально призводило до повного або часткового відновлення лейкоцитів та їхніх форм до контрольних значень. З іншого боку, введення хлорогенової кислоти внутрішньочеревно не мало такого вираженого ефекту на імунокомпетентні клітини, як його пероральне введення. При цьому, введення хлорогенової кислоти перорально та внутрішньочеревно спричиняло формування різних патернів морфотипів імунокомпетентних клітин у тварин.

ВИСНОВКИ

1. Було оцінено вплив хлорогенової кислоти та вітаміну А на кількість та характеристики еритроцитів у тварин на фоні інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю.
2. Виявлено вплив хлорогенової кислоти та вітаміну А на кількість деяких імунокомпетентних клітин у тварин на тлі інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю.
3. Доведено, що співвідношення між досліджуваними типами клітин, яке оцінювали за їх збільшенням у порівнянні з контрольним рівнем, відрізнялося у тварин, які отримували ХК на тлі інтоксикації від тварин після інтоксикації

Різні способи введення хлорогенової кислоти в організм виявляли різні ефекти на показники еритрона у тварин із Си-індукованим фіброзом печінки. Так, після внутрішньочеревного введення в організм хлорогенової кислоти виявляли глибші та системніші зміни показників еритроцитів порівняно із введенням хлорогенової кислоти *per os*, і ці зміни були схожі на дію, спричинену дією вітаміном А.

Введення вітаміну А тваринам після інтоксикації організму сірчаною кислотою міддю не чинило впливу на кількість і патерн імунокомпетентних клітин.

Введення тваринам після інтоксикації хлорогенової кислоти *per os* призводило до повного або часткового (окрім моноцитів) відновлення лейкоцитів та їхніх форм до контрольних значень, тоді як введення ХК внутрішньочеревно не чинило такого вираженого ефекту на імунокомпетентні клітини, як її введення *per os*, при цьому в тварин, які одержували ХК *per os* та внутрішньочеревно, формувалися різні патерни морфотипів імунокомпетентних клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Rong T. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2020. № 2(12). P. 1231-1246.
2. Нековаль І. В., Казанюк Т. В. Фармакологія: підручник. К.: ВСВ «Медицина», 2011. 520 с.
3. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник/ під. ред. А. М. Гродзінського. К.: «Українська енциклопедія» ім. М. П. Бажана, 1992. 544 с.
4. Тржецинський С. Д., Доля В. С., Денисенко О. М. Лікарські рослини і лікарська рослинна сировина, які містять фенольні сполуки, алкалоїди і різні групи БАР. Запоріжжя: ЗДМУ, 2014. 136 с
5. Farah A., Dodadgelo C.M. Phenolic compounds in coffee // *Braz. J. Plant Physiol.* 2006. V. 18(1). P. 23–26.
6. Grace S.C., Logan B.A. Adams W.W. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens* // *Plant Cell Environment.* 1998. V. 21. P. 513–521.
7. Koriem KM, Soliman RE (2014) Chlorogenic and caftaric acids in liver toxicity and oxidative stress induced by methampheta-mine. *J Toxicol*
8. Moores R. G., McDermott D. L., Wood T. R. Determination of Chlorogenic Acid in Coffee. *Analytical Chemistry.* 1948. Vol. 20, no. 7. P. 620–624.
9. Clifford MN: Chlorogenic acids and othercinnamates – nature, occurrence, dietaryburden, absorption and metabolism. *J Sci FoodAgric*2000; 80:1033 – 1043
- 10.Greenberg JA, Boozer CN, Geliebter A: Coffee,diabetes, and weight control. *Am J Clin Nutr*2006; 84:682 – 693
- 11.Potent Odorants of Raw Arabica Coffee. Their changes during roasting. *J Agric Food Chem.* 2000, 48, 868–872.

12. Wianowska, D. and A. L. Dawidowicz (2016). "Can matrix solid phase dispersion (MSPD) be more simplified? Application of solventless MSPD sample preparation method for GC–MS and GC–FID analysis of plant essential oil components." *Talanta* 151: 179-182.
13. Upadhyay, R. and L. J. Mohan Rao (2013). "An Outlook on Chlorogenic Acids—Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53(9): 968-984.
14. Wianowska, D. and M. Gil (2019). "Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids." *Phytochemistry Reviews* 18(1): 273-302.
15. Srinath, D. and U. Maheswari (2016). "Ultrasound technology in food processing: a review." *International Journal of Current Advanced Research* 5: 778-783.
16. Kaufmann, B. and P. Christen (2002). "Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction." *Phytochemical Analysis* 13(2): 105-113.
17. Upadhyay, R., K. Ramalakshmi, et al. (2012). "Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans." *Food Chemistry* 130(1): 184-188.
18. Mustafa, A. and C. Turner (2011). "Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review." *Analytica Chimica Acta* 703(1): 8-18.
19. Khaw, K.-Y., M.-O. Parat, et al. (2017). "Solvent Supercritical Fluid Technologies to Extract Bioactive Compounds from Natural Sources: A Review." *Molecules (Basel, Switzerland)* 22(7): 1186.
20. Torres-Mancera, M. T., I. Baqueiro-Peña, et al. (2013). "Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi." *Biotechnology Progress* 29(2): 337-345.

21. Clifford, Michael N., I. B. Jaganath, et al. (2017). "Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity." *Natural Product Reports* 34(12): 1391-1421.
22. Lee J. et al. Coffee and its bioactive components, coffee chlorogenic acid and coffee melanoidins, increase the expression of antioxidant genes and prevent the activation of hepatic stellate cells in methionine-choline-deficient rats. *Nutr Res Pract*, 2015. № 9(5). P. 437-443.
23. Kim H., Kim K., Lee E., Cho, S. The Chlorogenic Acid Inhibits IL-1 β and TNF- α Expression in the Human Monocytic THP-1 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010. № 58(9). P. 5327-5334.
24. Bakuradze T. et al. Antioxidant-rich coffee reduces DNA damage, elevates glutathione status and contributes to weight control: results from an intervention study. *Molecular nutrition & food research*, 2010. № 54(12). P. 1722-1733.
25. Thom E., Wadley G. D., Gao J. The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. *Journal of International Medical Research*, 2017. № 45(5). P. 178-187.