

**ЗВІТ**  
**ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ**  
**«АНАЛІЗ ПЕПТИДНОЇ СКЛАДОВОЇ КОМПЛЕКСІВ**  
**Relive Balance MIX та Relive Balance PRO»**

Керівник НДР  
завідувач кафедри біохімії  
ННЦ «Інститут біології та медицини»  
д.б.н., проф.

Олексій САВЧУК

## ВСТУП

Розширення уявлень щодо участі та ролі пептидів в підтриманні належного фізіологічного статусу організму та узагальнення накопиченого масиву клінічних і експериментальних у вигляді концепції «пептидоергічної регуляції гомеостазу» створює передумови для розроблення принципово нових підходів для корекції метаболічних порушень. Відповідно до концепції пептидної регуляції, пептиди розглядаються як універсальні біорегулятори, що контролюють перебіг багатьох процесів та задіяні у підтримці структурного і функціонального гомеостазу [1,2]. До переваг пептидних препаратів можна віднести їхню безпечність навіть при довготривалому застосуванні, відсутність побічних ефектів, виражені терапевтичні ефекти навіть за незначних доз та той факт, що вони не накопичуються в організмі і швидко метаболізують [3].

На сьогодні встановленим є взаємозв'язок між неконтрольованою активізацією вільно радикальних реакцій та виникненням порушень, що становлять патологічне підґрунтя для розвитку ендокринних, нейродегенеративних, онкологічних та серцево-судинних захворювань. Сучасні умови життя, негативний вплив факторів зовнішнього середовища, психоемоційне навантаження, генетичні фактори – все це є передумовою для порушення окисно-відновної рівноваги та розвитку оксидативного стресу. Активізувати захисний потенціал організму можна за допомогою антиоксидантної терапії або шляхом регулярного вживання продуктів з антиоксидантними властивостями. Серед світових тенденцій в області профілактики розвитку низки хвороб, патогенез яких супроводжується розвитком оксидативного дисбалансу, можна виділити посилення інтересу до використання препаратів на основі біологічно активних речовин, що виявляють антиоксидантну активність та поступової заміни синтетичних антиоксидантів на природні речовини [4,5]. При цьому значно зріс інтерес науковців та клініцистів до пептидів з антиоксидантними властивостями, як можливих діючих складових засобів профілактики та терапії станів,

асоційованих з розвитком оксидативного стресу. Однією з найважливіших властивостей таких пептидів є здатність пригнічувати розвиток вільно радикальних процесів, що має велике значення при реалізації протипухлинного захисту, уповільненні процесів старіння організму, а також при різних інтоксикаціях.

**Метою дослідження** було проаналізувати пептидну складову комплексів Relive Balance MIX та Relive Balance PRO та дослідити антиоксидантний потенціал пептидних молекул, що входять до складу комплексів.

## **МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

### **Одержання пептидної фракції**

Фракцію пептидів отримували відповідно до методу [6]. Для одержання фракції пептидів до 1 г досліджуваного зразка додавали 50 мМ трис-НСІ буфер, рН 7,4, що містить 130 мМ NaCl, пробу залишали на струшувачі з невеликою амплітудою на 30 хв, після чого центрифугували при 800 g 10 хв для відділення нерозчинних часток. До надосадової рідини додавали 1,2 М HClO<sub>4</sub> у співвідношенні 1:1, залишали на 30 хв при +4°C, після чого центрифугували 15 хв при 1500 g. Надосадову рідину нейтралізували 5 н КОН до рН 7,0, залишали на 15 хв та повторно центрифугували. До надосадової рідини додавали 80 % етиловий спирт у співвідношенні 1:5, проби витримували 15 хв та знову центрифугували 15 хв при 1500 g. Отриману фракцію пептидів розводили вдвічі дистильованою водою та ліофілізували.

### **Визначення концентрації пептидів**

Концентрацію пептидів визначали спектрофотометрично на спектрофотометрі Smart SpecTMPlus (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 210 нм проти холостої проби, що піддавалась таким ж процедурам, як і дослідні проби, але не містила фракції пептидних молекул. Для побудови калібрувального графіка використовували дипептид N-карбокси-гліцил-гліцин.

### **Метод одновимірного електрофорезу у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію**

Електрофоретичний аналіз пептидної фракції проводили методом диск-електрофорезу у поліакриламідному гелі за денатуруючих умовах згідно з методикою Лемлі [7]. Електрофорез проводили у пластинах 18 % розділяючого та 4 %

концентруючого (використовується для концентрування білків в результаті ізотахофорезу) гелів. Електрофорез проводили в камерах для вертикального препаративного диск-електрофорезу (Bio-Rad Laboratories, Inc, США) у пластинах товщиною 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого та 36 мА для розділюючого гелів. По закінченні електрофорезу гелі витримували в фіксуєчо-забарвлюючій суміші, що містила 2,5 % кумасі діамантовий синій G-250 (чутливість до 100 нг на білкову смугу), 10 % етанол, 10 % оцтову кислоту та 15 % ізопропанол. Для рівномірного профарбовування ємність з гелями поміщали на автоматичний струшувач з середньою амплітудою. Для видалення залишків барвника гелі відмивали кип'ятінням у 2-8 % розчині оцтової кислоти. Для встановлення молекулярних мас білків використовували маркерні суміші «SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range» та «SDS-PAGE Molecular Weight Standards, High Range», «SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Peptides» (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Отримані електрофореграми аналізували за допомогою програми TotalLab 2.04.

Проби для електрофорезу готували, додаючи до проб, рівний об'єм буферу для проб (5 мМ трис-НСІ буфер, рН 8,3, що містив 38 мМ гліцин, 2 % додецилсульфат натрію, 10 % сахарозу та 0,01 % бромфеноловий синій). Проби перед внесенням в гель кип'ятили впродовж 45-50 с,

### **Хроматографія, що поділяє за розмірами**

Одержані пептидні фракції аналізували методом хроматографії, що поділяє за розмірами, на носіїві Sephadex G 15 (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). На колонку, попередньо врівноважену 0,05 М трис-НСІ буфером, рН 7,4, що містить 0,13 М NaCl наносили досліджувані проби, розчинені у цьому ж буфері. Перед нанесенням проби центрифугували при 800 g для відділення нерозчинних домішок. Швидкість на всіх етапів хроматографічного процесу становила 0,5 мл/хв. Площі під піками хроматографічних кривих розраховували за допомогою OriginLab (версія 9.1). Молекулярну масу пептидів оцінювали за допомогою калібрувальної кривої. Для

цього на колонку наносили низькомолекулярні маркери - лізоцим (14,3 кДа), інсулін (5,7 кДа) і вітамін В12 (1,35 кДа).

### Визначення загальної антиоксидантної активності

Загальну антиоксидантну активність оцінювали за відновленням стабільної сполуки 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилу (ДФПГ) [8,9]. Спосіб оцінки базується на колориметрії вільних радикалів та заснований на реакції ДФПГ, розчиненого в метанолі (етанолі), зі зразком антиоксиданту (АН) за схемою:  $DPPH^{\cdot} + AN \rightarrow DPPH-H + A^{\cdot}$ . У результаті відновлення DPPH антиоксидантом знижується пурпурне забарвлення спиртового розчину DPPH, а реакція контролюється по зміні оптичної густини при 515 нм.

Досліджувану пробу змішували з 0,15 мМ розчином ДФПГ, який готували, розчиняючи реактив у 96% етиловому спирті. Проби залишали у темряві при кімнатній температурі на 30 хв, після чого вимірювали оптичну щільність проб на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 517 нм. Бланком для кожного тестового зразка був розчин відповідного зразка у 96% етиловому спирті. Контрольна проба містила суміш спиртового розчину ДФПГ з відповідним об'ємом розчинника, замість тестового зразка. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища був однаковий для всіх проб і становив 0,25 мл.

Загальну антиоксидантну активність виражали у відсотках, використовуючи наступну формулу:

$$\% = (A_{\text{контроль}} - A_{\text{зразок}}) / A_{\text{контроль}} \times 100, \text{ де}$$

$A_{\text{контроль}}$  – адсорбція контрольної проби,  $A_{\text{зразок}}$  – адсорбція проби, що містила зразок спиртового чи водного розчину досліджуваного комплексу.

Перед проведенням розрахунку від значень  $A_{\text{контроль}}$  та  $A_{\text{зразок}}$  віднімали значення відповідних бланків. Виміри проводили у трьох кратній повторності.

Додатково загальну антиоксидантну активність було оцінено за інтенсивністю гальмування продукції малонового діальдегіду (МДА). Загальну антиоксидантну активність оцінювали, використовуючи стандартну методику окиснення Твін-80 до МДА за присутності аскорбінової кислоти та іонів металу перехідної валентності (феруму 2+) у присутності досліджуваних зразків. Вміст МДА визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою, яка при високій температурі в кислому середовищі протікає з утворенням кольорового триметинового комплексу. Оптичну густина досліджуваних зразків вимірювали спектрофотометрично при довжинах хвиль  $\lambda=535$ . Концентрацію ТБК-активних продуктів у пробах виражали в мкМ МДА, використовуючи коефіцієнт молярної екстинції утвореного комплексу  $156 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ .

### **Оцінка редукуючої здатності пептидів**

Метод визначення редукуючої здатності ґрунтується на здатності антиоксидантів відновлювати  $\text{Fe}^{3+}$  у  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  до  $\text{Fe}^{2+}$ . Продукт такої реакції далі реагує з  $\text{FeCl}_3$  ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) з утворенням Берлінської лазури ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ) з максимальним поглинанням при 700 нм. Ступінь поглинання реакційної суміші при 700 нм може опосередковано відображати редукуючу здатність антиоксиданту. Редукуючу здатність оцінювали відповідно до методу [10]. Досліджувані проби змішували з 0,2 М натрій-фосфатним буфером, рН 6,6 та 0,05 % розчином калій ферріціаніду. Бланкова проба замість калій ферріціаніду містила відповідний об'єм дистильованої води. Контрольна проба містила суміш калій ферріціаніду та 0,2 М натрій-фосфатний буфер, рН 6,6. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища був однаковий для всіх проб і становив 1 мл. Проби поміщали у водяну баню при  $50^\circ\text{C}$  на 20 хв, після чого додавали 5% трихлороцтову кислоту. Після центрифугування, надосадову рідину змішували з рівним об'ємом дистильованої води і додавали 0,1% розчин сульфату заліза (III). Суміш залишали на 10 хв, після чого вимірювали оптичну щільність проб на

мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 700 нм.

Редукуючу здатність розраховували за формулою:

$$\% = (A_{\text{зразок}} - A_{\text{контроль}}) / A_{\text{зразок}} \times 100, \text{ де}$$

$A_{\text{контроль}}$  – адсорбція контрольної проби,  $A_{\text{зразок}}$  – адсорбція проби, що містила зразок спиртового чи водного розчину досліджуваного комплексу. Перед проведенням розрахунку від значень  $A_{\text{контроль}}$  та  $A_{\text{зразок}}$  віднімали значення відповідних бланків. Виміри проводили у трьох кратній повторності.

### **Оцінка здатності пептидів знешкоджувати гідроксильні радикали**

У цьому методі гідроксильні радикали утворювалися під час реакції Фентона між  $\text{H}_2\text{O}_2$  і  $\text{Fe}^{2+}$ , а  $\text{Fe}^{2+}$  у водному розчині о-фенантроліну окислювався до  $\text{Fe}^{3+}$ , що призводило до зменшення поглинання при 536 нм. Ступінь інгібування швидкості зниження поглинання при 536 нм досліджуваної проби відображав здатність проби поглинати (хелатувати) гідроксильні радикали. Визначення проводили відповідно до методу [11,12]. Досліджувані проби змішували з 0,2 мМ розчином сульфату заліза та 0,01% перекисом водню. Проби залишали при кімнатній температурі на 10 хв, після чого додавали 0,2 мМ розчин фенантроліну. Бланкова проба замість сульфату заліза та перекису водню містила відповідний об'єм дистильованої води. Контрольна проба містила суміш 0,2 мМ розчину сульфату заліза та фенантроліну. Негативним контролем слугувала проба, що містила всі складові за виключення досліджуваних зразків. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища був однаковий для всіх проб і становив 0,25 мл. Оптичну щільність проб вимірювали на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 510 нм.

Розрахунок здатності хелатувати гідроксильні радикали проводили за формулою:

$$\% = (A_{\text{зразок}} - A_{\text{негативний контроль}}) / (A_{\text{контроль}} - A_{\text{негативний контроль}}) \times 100, \text{ де}$$

$A_{\text{контроль}}$  – адсорбція контрольної проби,  $A_{\text{негативний контроль}}$  – адсорбція проби, що містила всі складові за виключення досліджуваних зразків,  $A_{\text{зразок}}$  – адсорбція проби, що містила зразок спиртового чи водного розчину досліджуваного комплексу. Перед проведенням розрахунку від значень  $A_{\text{контроль}}$  та  $A_{\text{зразок}}$  віднімали значення відповідних бланків. Виміри проводили у трьох кратній повторності.

### Оцінка здатності пептидів знешкоджувати NO радикали

Метод ґрунтується на визначенні оксиду азоту, який утворюється при розкладанні водних розчинів нітропрусиду натрію за рН 7,4, у реакції з реактивом Грісса [13]. Згенеровані таким чином нітроген-вмісні молекули виявляють шляхом подальшої взаємодії з реактивом Грісса.

Досліджувані проби змішували з 10 мМ розчином нітропрусиду натрію, який розчиняли у 0,1 М натрій-фосфатному буфері, рН 7,4. Бланком для кожного тестового зразка був розчин відповідного зразка у 0,1М Na-фосфатному буфері, рН 7,4. Контрольна проба містила суміш розчину нітропрусиду натрію з відповідним об'ємом розчинника, замість тестового зразка. Кінцевий об'єм інкубаційного середовища був однаковий для всіх проб і становив 0,3 мл. Проби залишали у темряві при кімнатній температурі на 120 хв, після чого від них відбирали аліквоту об'ємом 0,1 мл і переносили в лунки 96-лункового мікропланшету. До всіх проб, включаючи бланки та контроль, додавали 5% водний розчин реактиву Грісса. Проби залишали в темряві при кімнатній температурі на 30 хв, після чого вимірювали оптичну щільність проб на мікропланшетному спектрофотометрі (BioTek Instruments, BioTek, USA) при довжині хвилі 546 нм.

Здатність знешкоджувати NO радикал виражали у відсотках уловлення NO і розраховували за формулою:

$$\% = (A_{\text{контроль}} - A_{\text{зразок}}) / A_{\text{контроль}} \times 100, \text{ де}$$

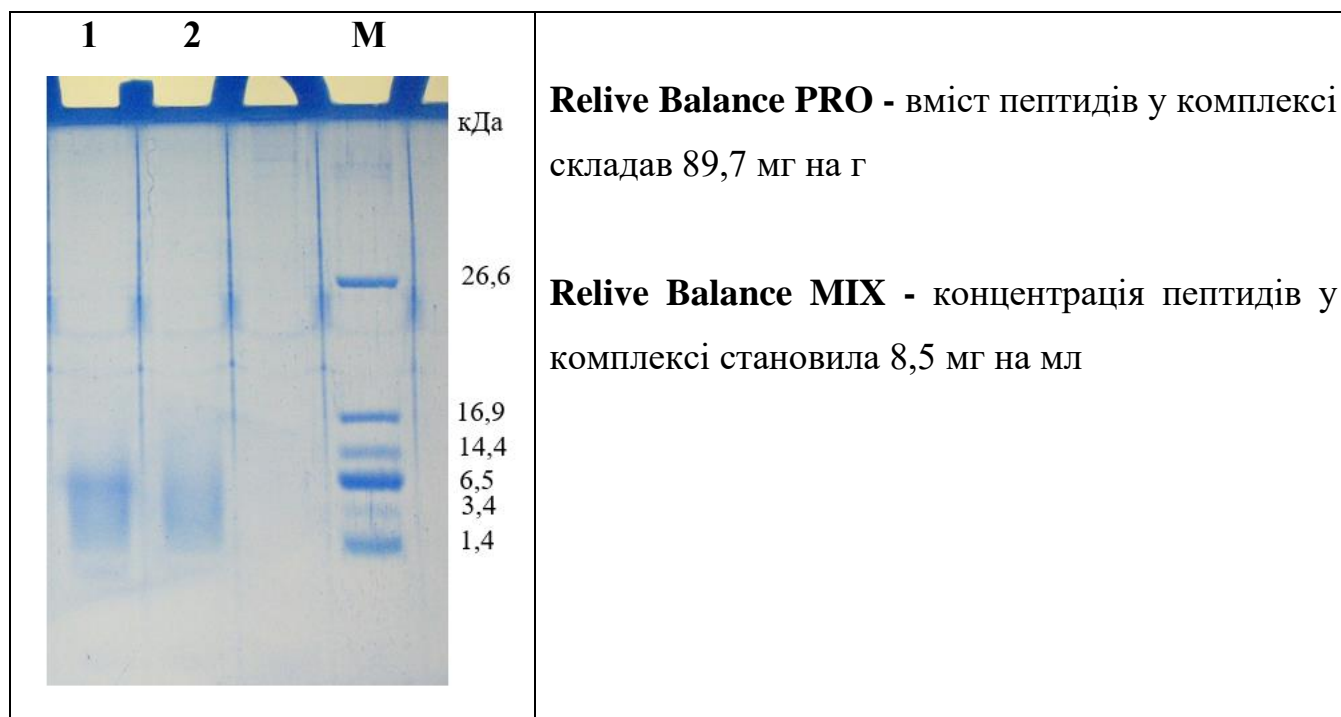
$A_{\text{контроль}}$  – адсорбція контрольної проби,  $A_{\text{зразок}}$  – адсорбція проби, що містила зразок спиртового чи водного розчину досліджуваного комплексу. Перед проведенням розрахунку від значень  $A_{\text{контроль}}$  та  $A_{\text{зразок}}$  віднімали значення відповідних бланків. Виміри проводили у трьох кратній повторності.

### **Статистична обробка**

Статистичну обробку отриманих результатів проводили використанням комп'ютерної програми «Microsoft Excel 2016».

## ОДЕРЖАНІ РЕЗУЛЬТАТИ

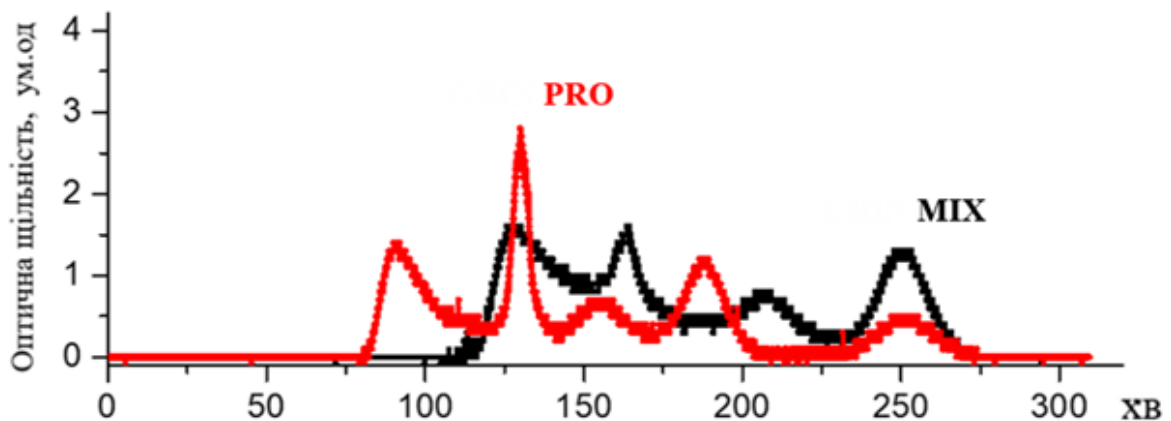
Перший етап дослідження включав одержання пептидної фракції з комплексів Relive Balance PRO і Relive Balance MIX та характеристику пептидної складової за молекулярною масою. Для того, щоб визначити діапазон молекулярних мас пептидів, отримані пептидні фракції було проаналізовано методом електрофорезу у 18% поліакриламідному гелі. Відповідно до результатів електрофоретичного аналізу (рис.1), молекулярна маса пептидних молекул, присутніх у фракціях, була нижче 6 кДа. Така молекулярна маса пептидів підвищує ймовірність присутності серед пептидної фракції біологічно активних молекул, адже відповідно до літератури, біологічна активність притаманна переважно пептидам з молекулярною масою до 5 кДа. Так, молекулярна маса більшості антимікробних пептидів становить близько 5 кДа [343,344], а пептиди з вираженою антиоксидантною активністю характеризуються молекулярною масою від 0,5 до 1,5 кДа [345,346].



**Рис.1.** Електрофореграма фракцій пептидів, одержаних з досліджуваних комплексів: 1 – Relive Balance PRO; 2 – Relive Balance MIX; М - маркери молекулярних мас

Встановлено, що концентрація пептидів у комплексі Relive Balance MIX становила 8,5 мг на мл досліджуваного зразка, а вміст пептидів у комплексі Relive Balance PRO складав 89,7 мг на г досліджуваного зразка.

Для більш детальної характеристики пептидної складової досліджуваних комплексів було проведено хроматографічний аналіз одержаних пептидних фракцій, що дозволило оцінити гетерогенність пептидних фракцій.



**Рис.2.** Хроматографічний профіль пептидів, що присутні у комплексах Relive Balance MIX та Relive Balance PRO

Хроматографічні профілі пептидів, що присутні у комплексах Relive Balance MIX та Relive Balance PRO (рис.2), свідчать про присутність молекул різної молекулярної маси. До складу пептидної складової комплексу Relive Balance PRO входило 5 фракцій пептидів з молекулярними масами від 807 Да до 5239 Да, у той час як пептидна фракція, одержана з комплексу Relive Balance MIX містила 4 субфракції у діапазоні молекулярних мас від 809 Да до 4355 Да (табл.1). Пептидна складова Relive Balance MIX містила найбільше пептидів з молекулярною масою 4355,36 Да, а пептидна фракція Relive Balance PRO – пептидів з молекулярною масою 3985,49 Да

**Загальна характеристика пептидної складової комплексів Relive Balance MIX та Relive Balance PRO**

№ піка	Relive Balance MIX		Relive Balance PRO	
	Площа під піком	Молекулярна маса, Да	Площа під піком	Молекулярна маса, Да
1	0,21	4355,36	0,19	5239,77
2	0,12	2992,65	0,23	3985,49
3	0,10	1107,09	0,11	3258,24
4	0,17	809,21	0,17	2381,43
5	-	-	0,13	807,43

На другому етапі дослідження було оцінено антиоксидантний потенціал пептидів, що входять до складу комплексів Relive Balance MIX та Relive Balance PRO. Серед біологічних активностей, що мають значний профілактичний та терапевтичний потенціал, вирізняють антиоксидантну активність. Препарати, до складу яких входять пептиди з антиоксидантними властивостями, можуть бути використані для підтримання антиоксидантного статусу організму, виснаженість якого зростає з віком, в умовах зростаючого техногенного навантаження, за розвитку патологічних станів. Відомо, що багато хвороб (цукровий діабет, ішемічна хвороба серця, атеросклероз, хвороба Альцгеймера та ін.) супроводжуються порушенням антиоксидантної рівноваги та розвитком оксидативного стресу. Більш того, доведеним є факт, що оксидативний стрес це не лише наслідок прогресування патологічного процесу, а часто один з тригерів розвитку захворювання.

З огляду на це, підтримка антиоксидантного статусу організму за рахунок систематичного вживання продуктів чи біологічно активних добавок, компоненти яких виявляють антиоксидантну активність, може розглядатися як етап превентивної стратегії профілактики розвитку станів, асоційованих з оксидативним стресом [14]. Застосування препаратів комплексної дії, що знижують ймовірність утворення

вільних радикалів дозволяє здійснювати корекцію метаболічних та функціональних змін на рівні окремих клітинних структур, попереджуючи таким чином розвиток органних та системних порушень.

Для визначення антиоксидантного потенціалу пептидних фракцій, одержаних з комплексів Relive Balance MIX та Relive Balance PRO, було використано низку методик, що дозволило провести комплексну оцінку антиоксидантних властивостей досліджуваних комплексів.

Спочатку було визначено загальну антиоксидантну активність, яка є інтегральним показником, і дає змогу попередньо визначити чи виявляє сполука антиоксидантні властивості. Принцип визначення ґрунтується на здатності реагенту ДФПГ приєднувати електрон, донором якого слугує досліджувана сполука. У цьому та подальших тестах як референтну сполуку було використано аскорбінову кислоту за концентрацій 2 мМ та 10 мМ.

Таблиця 2

**Загальна антиоксидантна активність пептидів, що присутні у комплексах Relive Balance MIX та Relive Balance PRO, оцінена в тесті з реагентом ДФПГ (M±m)**

Досліджуваний показник	Референтна сполука (аскорбінова кислота)		Пептидна фракція, що входить до складу комплексу	
	2 мМ	10 мМ	Relive Balance MIX	Relive Balance PRO
Загальна антиоксидантна активність, %	33±3	32±4	39±2	65±2

Відповідно до одержаних результатів (табл.2), загальна антиоксидантна активність пептидної складової комплексу Relive Balance MIX була подібною до такої у референтної сполуки, у той час як загальна антиоксидантна активність пептидної складової комплексу Relive Balance PRO була майже вдвічі вищою у порівнянні з антиоксидантною активністю референтної сполуки, що свідчить про високий антиоксидантний потенціал досліджуваного комплексу.

Незважаючи на достатньо високу загальну антиоксидантну активність, притаманну пептидній складовій досліджуваних комплексів, застосування пептидів не впливало на рівень утворення малонового диальдегіду (табл.3) – досліджуваний показник залишався у межах значень позитивного контролю.

Таблиця 3

**Здатність пептидів, що присутні у комплексах Relive Balance MIX та Relive Balance PRO, гальмувати продукцію малонового диальдегіду ( $M \pm m$ )**

Досліджуваний показник	Контроль		Пептидна фракція, що входить до складу комплексу	
	Негативний контроль (без індуктора окиснення)	Позитивний контроль (за присутності індуктора окиснення)	Relive Balance MIX	Relive Balance PRO
Концентрація МДА, що утворився внаслідок окиснення Твін-80, мкМ	0,218	1,333	1,404	1,282

Наявність загальної антиоксидантної активності на тлі відсутності впливу на утворення проміжних продуктів перекисного окиснення ліпідів (на прикладі малонового диальдегіду) опосередковано свідчать про помірний антиоксидантний ефект пептидної складової досліджуваних комплексів, що дозволяє розглядати їх як засіб профілактики розвитку оксидативного стресу, а не засіб для терапії станів з вираженим порушенням прооксидантно-оксидантної рівноваги. Слід зауважити, що згідно останніх досліджень на тваринах, систематичний прийом високоактивних антиоксидантних засобів є потенційним тригером розвитку пухлин та посилення метастазування при раку легень, меланомах, пухлинах кишківника. Такі результати викликають занепокоєння щодо доцільності включення активних синтетичних антиоксидантів у протоколи тривалої антиоксидантної терапії та спонукають до пошуку менш шкідливих речовин з антиоксидантними властивостями. З цих причин

більш доцільним є вживання продуктів чи біологічно активних добавок природного походження, компоненти яких виявляють помірну антиоксидантну активність.

Результати проведеного дослідження не виявили у пептидів що присутні у комплексах Relive Balance MIX та Relive Balance PRO, здатності впливати на рівень NO-радикалів.

Серед інформативних тестів оцінки антиоксидантної активності сполук є їх редукуюча здатність, саме цей показник дозволяє зробити висновок про наявність антирадикальних властивостей. У даному методі речовини з антиоксидантними властивостями утворюють забарвлений комплекс з ферицианідом калію, трихлороцтовою кислотою та хлоридом заліза, який детектується при 700 нм, при цьому зростання адсорбції проби вказує на здатність сполук виступати у якості відновника.

Отримані нами результати підтверджують наявність редукуючої активності у досліджуваних пептидних фракцій (табл.4).

Таблиця 4

**Редукуюча здатність пептидів, що присутні у комплексах  
Relive Balance MIX та Relive Balance PRO (M±m)**

Досліджуваний показник	Референтна сполука (аскорбінова кислота)		Пептидна фракція, що входить до складу комплексу	
	2 мМ	10 мМ	Relive Balance MIX	Relive Balance PRO
Редукуюча здатність, %	92±3	97±3	38±4	61±2

Так, редукуюча здатність пептидів комплексу Relive Balance PRO становила 61±2 %, редукуюча здатність пептидів комплексу Relive Balance MIX знаходилась на рівні 38±4 %. Слід наголосити, що результати визначення редукуючої здатності пептидів повністю узгоджуються з даними визначення загальної антиоксидантної активності.

Реалізація багатьох біохімічних реакцій та, відповідно, підтримання належного метаболічного статусу організму не можливе без участі металів змінної валентності, які входять до складу низки клітинних білків, білків плазми крові та необхідні для прояву і регуляції активності металозалежних ферментів. Проте при порушенні збалансованості між окремими ланками прооксидантно-антиоксидантної системи іони металів змінної валентності можуть стати вагомим чинником, що провокує утворення активних кисневих метаболітів та гідропероксидів.

Численними роботами доведена прооксидантна роль металів змінної валентності ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$  і ін.), як у хімічних, так і біологічних модельних системах. Ініціююча роль металів в утворенні активних кисневих метаболітів і розгалуженні ланцюгів вільно радикального окиснення, а також перетворення деяких з них із прооксидантів в антиоксиданти і навпаки залежить від зв'язування металу, зміни його концентрації, відсутності достатньої кількості відновників в біологічних системах. Найбільш істотна роль в ініціюванні ВРО та утворенні активних форм кисню належить  $\text{Fe}^{2+}$ , а вірніше окисно-відновній парі  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ . Формування вільних радикалів, викликане металами, викликає різноманітні модифікації основ ДНК, збільшення рівня пероксидації ліпідів, зміни рівня кальцію і сульфгідрильного гомеостазу. Пероксидація ліпідів, утворені внаслідок дії вільних радикалів на залишки поліненасичених жирних кислот фосфоліпідів, можуть далі реагувати з окисно-відновними металами, що призводить до утворення мутагенного та канцерогенного МДА, 4-гідроксинонєналу й інших екзоциклічних аддуктів ДНК.

Отримані результати свідчать про здатність пептидів, що присутні у комплексах, знижувати рівень гідроксильних радикалів - досліджуваний показник складав  $41 \pm 3$  % та  $67 \pm 3$  %, відповідно, для пептидної складової з комплексу Relive Balance MIX та Relive Balance PRO.

**Здатність пептидів, що присутні у комплексах Relive Balance MIX та Relive Balance PRO, хелатувати гідроксильні радикали ( $M \pm m$ )**

Досліджуваний показник	Референтна сполука (аскорбінова кислота)		Пептидна фракція, що входить до складу комплексу	
	2 мМ	10 мМ	Relive Balance MIX	Relive Balance PRO
Здатність до хелатування гідроксильних радикалів, %	-	15±2	41±3	67±3

Виявлена здатність пептидів досліджуваних комплексів впливати на рівень гідроксильних радикалів є достатньо перспективною характеристикою, оскільки, незважаючи на їх недовговічність, гідроксильні радикали належить до найбільш агресивних кисневих метаболітів, які здатні окислювати білки, нуклеїнові кислоти та ліпіди, обумовлюючи порушення детермінованих властивостей біологічних молекул.

Отже, підсумовуючи результати визначення антиоксидантної активності пептидних складових комплексів Relive Balance MIX та Relive Balance PRO, можемо зробити висновок, що досліджувані комплекси характеризуються певним антиоксидантним потенціалом, який виражається у здатності гасити вільні радикали, зокремаДФПГ, хелатувати гідроксильний радикал; також було виявлено редукуючу активність. З іншого боку, пептиди, що присутні у обох комплексах, не є хелаторами NO радикалів, а також не інгібують продукцію малонового альдегіду у реакції окиснення Твін-80.

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено наявність у складі комплексів Relive Balance MIX та Relive Balance PRO пептидної складової.
2. Молекулярна маса пептидів, оцінена методами електрофорезу та хроматографії, що поділяє за розмірами, знаходиться у діапазоні молекулярних мас від 800 Да до 5239,77 Да для пептидів з комплексу Relive Balance PRO та 4355,36 Да для пептидів з комплексу Relive Balance MIX.
3. Пептидні молекули, присутні у складі пептидних фракції обох досліджуваних комплексів виявляли помірні антиоксидантні властивості, що підтверджується у тестах визначення загальної антиоксидантної активності, оцінки редукуючої здатності та здатності хелатувати гідроксильні радикали.
4. За всіма досліджуваними показниками пептиди, що входять до складу комплексу Relive Balance PRO, виявилися більш ефективними, що узгоджується з більшою гетерогенністю пептидної фракції за таким параметром як молекулярна маса пептидів.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Foreman RE, George AL, Reimann F, Gribble FM, Kay RG. Peptidomics: a review of clinical applications and methodologies. *J Proteome Res.* 2021;20(8):3782-3797.
2. Schulz-Knappe P, Schrader M, Zucht HD. The peptidomics concept. *Comb Chem High Throughput Screen.* 200;8(8):697-704.
3. Kumar MS. Peptides and peptidomimetics as potential antiobesity agents: overview of current status. *Front. Nutr., Sec. Nutrition and Food Science Technology.* 2019;6.
4. Kaspar AA, Reichert JM. Future directions for peptide therapeutics development. *Drug Discov. Today.* 2013;18:807-817.
5. Manning MC, Chou DK, Murphy BM, Payne RW, Katayama DS. Stability of protein pharmaceuticals: an update. *Pharm. Res.* 2010; 27:544-575.
6. Николайчик, В., Моин, В. и Кирковский, В. (1991). Способ определения средних молекул. *Лабораторное дело*, 10, С. 13–18.
7. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(1):680-685.
8. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
9. Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106(2), 444–450.
10. Wang, X., Xing, R., Chen, Z., Yu, H., Li, R., & Li, P. (2014). Effect and mechanism of mackerel (*Pneumatophorus japonicus*) peptides for anti-fatigue. *Food & Function*, 5(9), 2113.
11. De Avellar, I. G. J., Magalhães, M. M. M., Silva, A. B., Souza, L. L., Leitão, A. C., & Hermes-Lima, M. (2004). Reevaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1675(1-3), 46–53.

12. Wang S, Gan Y, Mao X, Kan H, Li N, Zhang C, Wang Z, Wang Y. Antioxidant Activity Evaluation of Oviductus Ranae Protein Hydrolyzed by Different Proteases. *Molecules*. 2021 Mar 15;26(6):1625.
13. Das, R. , Mitra,S., Mukherjee, K., Singh, U.P. and Ray Banerjee, E. (2015). Anti3Oxiflammatory Profile of Date Extracts (Phoenix sylvestris). *Biomedical Research And Therapy*, 2(6):2973317.
14. Zou ZV. Antioxidants promote intestinal tumor progression in mice. *Antioxidants*. 2021;10:241.