

И.М. Быков, Е.Е. Есауленко, Р.И. Сепиашвили, М.А. Хильчук

Оценка эффективности антиоксидантных свойств липофильных продуктов растительного происхождения *in vitro* методом липосомальной модельной тест-системы

В статье представлены результаты об изучении возможности эффективного использования липосомальных модельных тест-систем на основе фосфатидилхолиновых липосом для поиска и оценки антиоксидантных свойств у продуктов растительного происхождения, полученных как экспериментально, так и входящих в состав лекарственных препаратов. В экспериментальных группах, где использовались льняное масло, масла черного и грецкого ореха, фосфоглив, был обнаружен высокий антиоксидантный эффект, что позволяет сделать вывод о необходимости определения дальнейшей стратегии использования антиоксидантов в клинике.

Ключевые слова: фосфатидилхолиновые липосомы, антиоксидантная активность, перекисное окисление липидов, прооксидантные свойства.

ВВЕДЕНИЕ

В клетках в процессе метаболизма постоянно образуются токсичные активные формы кислорода (АФК). Они способны инициировать в организме реакции свободнорадикального окисления, вызывающие повреждение различных белков и пептидов, азотистых оснований и нуклеиновых кислот, липидов и других биомолекул. Свободные радикалы непосредственно повреждают ферментативные системы, а также оказывают прооксидантное действие, инициируя цепную реакцию перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к структурной и функциональной перестройке биологических мембран, повышению их проницаемости для ионов с последующим пространственным разобщением окислительных цепей [1, 8, 10, 16].

При различных патологических изменениях в организме в силу тех или иных причин развивается дисбаланс между интенсивностью свободнорадикальных процессов и функциональной активностью антиоксидантной

системы (АОС). Он играет ключевую роль при таких широко распространенных заболеваниях, как гепатит, атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, нейродегенеративные и аутоиммунные заболевания, диабетические ангиопатии, катаракта, некоторые формы рака, болезнь Дауна [1, 2, 5, 16]. В то же время у некоторых лекарственных препаратов, используемых для терапии этих заболеваний, были обнаружены прооксидантные свойства [4, 13]. Нарушения баланса интенсивности свободнорадикального окисления (СРО) и функционального статуса АОС отягощают течение любого заболевания и вынуждают искать пути диетологической и фармакологической их коррекции [3, 7, 12].

Данные предпосылки определяют актуальность целенаправленного поиска антиоксидантов с конкретными мишенями действия и определенными особенностями проявления антиоксидантных свойств. Важным этапом такого поиска является скрининг химических соединений, позволяющий отобрать антиоксиданты с определенным набором свойств.

© И.М. Быков, Е.Е. Есауленко, Р.И. Сепиашвили, М.А. Хильчук

Цель нашей работы – выявить эффективность использования модельной тест-системы на основе липосом для целенаправленного поиска и оценки антиоксидантных свойств липофильных продуктов растительного происхождения.

МЕТОДИКА

В работе исследованы липофильные продукты растительного происхождения, полученные как экспериментально, так и входящие в состав лекарственных препаратов: масло черного ореха (*Juglans nigra*); масло грецкого ореха (*Juglans regia*); масло льняное (производство «ИП Цыпляков А.Н.», Россия); масло оливковое («LOWARI», Италия); масло подсолнечное (производство ООО «Родник-98», Россия); масло кукурузное (производство ООО «Кубанская долина», Россия); эссенциале форте Н (A. Nattermann & Cie. GmbH, Германия); эссливер форте («Nabros Pharma», Индия); фосфоглив (ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА», Россия); ретинола ацетат (АЙ СИ ЭН Октябрь, Россия) [15].

Моноламеллярные липосомы получали из яичного фосфатидилхолина методом инъекции этанольного раствора липида в водную фазу. Для этого в 5 мл деионизированной воды, при постоянном интенсивном перемешивании, шприцом с тонкой иглой быстро впрыскивали 0,25 мл раствора фосфолипида необходимой концентрации в этаноле. Конечная концентрация фосфолипида в суспензии липосом в большинстве экспериментов составляла 2,38 мг/мл. Липофильные исследуемые вещества добавляли до нужной концентрации к этанольному раствору фосфолипидов перед приготовлением липосом [9].

Выбор концентраций, в которых исследуемые вещества вносили в модельную систему, осуществляли исходя из физиологических (для растительных масел – 1000 мг) или терапевтически достижимых (для лекарственных препаратов: эссенциале форте и эссливер форте – 1800 мг, фосфоглив – 390 мг, ретинола

ацетат – 1,5 мг) концентраций в тканях и биологических жидкостях организма человека.

Определение в суспензии липосом концентрации веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП), проводили следующим способом. К 0,5 мл суспензии липосом добавляли 0,5 мл 0,92 моль/л трихлоруксусной кислоты и 1 мл 49 ммоль/л 2-тиобарбитуровой кислоты (ТБК), нагревали 15 мин на кипящей водяной бане, центрифугировали 10 мин при 3000 мин⁻¹, после чего надосадочную жидкость фотометрировали при длинах волн 452 и 532 нм соответствующим образом обработанной контрольной пробы (деионизированная вода). Индукцию ПОЛ липосом вызывали добавлением сульфата железа (II). Полученные результаты выражали в микромолях малонового диальдегида (МДА), содержащегося в 1 л суспензии липосом, исходя из коэффициента молярной экстинкции МДА ($1,56 \cdot 10^5$ моль⁻¹ см⁻¹) [9, 11].

Эффективность антиоксидантного действия исследуемого химического соединения в каждой серии опытов и для каждой длительности периода окисления липосом рассчитывали по формуле: $[(C_0 - C_1) / C_0] \times 100 \%$, где C_0 и C_1 – концентрация ТБК-РП в суспензии липосом, не содержащей и содержащей исследуемое соединение (контроль и опыт соответственно). Если значение эффективности антиоксидантного действия было положительным, предположили, что тестируемое вещество проявляет антиоксидантное действие, а если отрицательным – прооксидантное [9].

Экспериментальные результаты были обработаны методами вариационной статистики с использованием критерия t Стьюдента. Достоверным считали различие при $P < 0,05$ [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение особенностей влияния на интенсивность ПОЛ отобранных для исследования растительных масел и лекарственных препара-

тов показало наличие у них антиоксидантных свойств (табл. 1, 2). Исследуемые продукты достоверно снижали содержание ТБК-РП в липосомах в течение первых 12 ч окисления. При дальнейшем исследовании процесса ПОЛ выраженность антиоксидантного действия заметно снижалась, а у ретинола ацетата проявлялись прооксидантные свойства.

Высокая антиоксидантная активность исследуемых продуктов на начальном этапе ПОЛ согласуется с известными данными о механизме антиоксидантного действия химических соединений, содержащих в своем составе ненасыщенные связи (фосфолипиды, триглицериды, жирорастворимые витамины и др.) [8, 13, 14]. Имея в своем составе реакционноспособные двойные связи, они перехватывают свободные радикалы – инициаторы ПОЛ, конкурируя за них с молекулами липидов и тем самым защищая последние от интенсивного окисления. Однако такая тенденция сохраняется лишь до тех пор, пока содержание антиоксиданта описанного типа достаточно для перехвата основного количества образующихся в ходе СРО радикалов. После истощения пула ан-

тиоксидантов с ненасыщенными связями скорость СРО существенно возрастает. Кроме того, при определенных условиях продукты окисления самих антиоксидантов этой группы могут вовлекаться в дальнейшее развитие реакций СРО, что определяет наличие у антиоксидантов с ненасыщенными связями прооксидантных свойств. По-видимому, отсутствие у растительных масел и фосфолипидных концентратов прооксидантных свойств было обусловлено наличием в их составе различных компонентов, обладающих антиоксидантными действиями.

В целом, по значению антиоксидантного эффекта исследуемые продукты можно расположить следующим образом: ретинола ацетат < оливковое масло < кукурузное масло < подсолнечное масло < эссливер форте < эссенциале форте < масло грецкого ореха < фосфоглив < масло черного ореха < льняное масло. В связи с этим для дальнейших исследований и клинических испытаний были отобраны четыре наиболее перспективных продукта (льняное масло, масло черного и грецкого орехов, фосфоглив), обладающие наиболее выраженными антиоксидантными

Таблица 1. Динамика содержания веществ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (мкмоль/л) в липосомах, содержащих исследуемые продукты ($M \pm m$; $n=10$)

Исследуемый продукт	Время окисления, ч				
	3	6	9	12	24
Суспензия липосом (контроль)	15,406±0,057	20,758±0,174	25,595±0,194	28,986±0,273	29,682±0,163
Ретинола ацетат	12,428±0,184*	16,619±0,351*	22,329±0,239*	27,286±0,194*	32,117±0,302*
Оливковое масло	11,533±0,155*	14,372±0,154*	20,345±0,165*	25,641±0,225*	29,402±0,202**
Кукурузное масло	9,449±0,168*	12,329±0,165*	17,532±0,126*	23,696±0,149*	28,391±0,192*
Подсолнечное масло	8,353±0,121*	11,958±0,156*	16,196±0,207*	22,425±0,161*	27,897±0,127*
Масло грецкого ореха	6,554±0,093*	8,399±0,123*	12,617±0,044*	19,459±0,091*	22,689±0,068*
Масло черного ореха	5,398±0,091*	6,521±0,084*	10,679±0,121*	17,708±0,052*	20,501±0,060*
Льняное масло	3,662±0,060*	5,633±0,051*	9,650±0,031*	16,795±0,019*	19,578±0,031*
Эссливер форте	7,624±0,064*	10,650±0,073*	14,841±0,163*	21,225±0,194*	24,845±0,189*
Эссенциале форте	7,085±0,111*	10,064±0,081*	14,075±0,049*	21,022±0,174*	24,254±0,185*
Фосфоглив	6,094±0,01*	7,497±0,048*	11,751±0,067*	18,311±0,094*	21,651±0,048*

* $P < 0,05$; ** $P > 0,05$.

Таблица 2. Эффективность антиоксидантного действия (%) изучаемых растительных продуктов (M± m; n=10)

Исследуемый продукт	Время окисления, ч				
	3	6	9	12	24
Ретинола ацетат	19,31±1,29	19,86±2,01	12,71±1,18	5,77±1,31	-8,21±0,90
Оливковое масло	19,12±1,23	20,24±1,94	12,71±1,11	5,30±1,32	0,94±0,50
Кукурузное масло	38,66±1,10	40,55±1,06	12,71±1,11	5,30±1,32	4,31±0,96
Подсолнечное масло	45,75±0,95	42,33±1,10	36,68±0,98	22,55±1,14	5,97±0,90
Масло грецкого ореха	57,46±0,56	59,53±0,59	50,67±0,47	32,81±0,77	23,54±0,54
Масло черного ореха	64,95±0,64	68,58±0,38	58,25±0,61	38,86±0,60	30,92±0,30
Льняное масло	76,23±0,39	72,84±0,36	62,28±0,28	42,01±0,56	34,02±0,39
Эссливер форте	50,52±0,36	48,66±0,51	41,99±0,72	26,73±0,85	16,28±0,72
Эссенциале форте	53,99±0,81	51,51±0,23	44,98±0,44	27,44±0,71	18,25±0,88
Фосфоглив	60,44±0,11	63,85±0,46	54,06±0,53	36,79±0,50	27,04±0,45

свойствами.

Таким образом, использование модельной тест-системы на основе фосфатидилхолиновых липосом является эффективным звеном для поиска новых продуктов с антиоксидантными свойствами. Подобный подход к оценке антиоксидантных свойств новых продуктов позволяет также выявить особенности их механизма действия, а также оценить возможности проявления ими прооксидантных свойств в зависимости от длительности окисления, что необходимо для определения дальнейшей стратегии использования антиоксидантов с лечебной целью.

REFERENCES

- Aksenova TA, Parkhomenko UV, Gorbunov VV. Peroxidation of lipids in hypertension combined with chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical lab. diagnostics*. 2008;(8):17-19.
- Alekseeva AS, Beloborodova EI, Raczkowski MI, Naumova EL, Lambrov EG, Philippova LP. Indicators of serotonin metabolism in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2008;146(11):512-514.
- Amosov BB, Lapin AA, Markov MV, Zelenkov VN. The antioxidant capacity of aqueous and alcoholic extracts of *Filipendula kamchatsky* (*Filipendula kamtschatica maxim.*). *Questions of biol. medicine and pharmaceutical chemistry*. 2009;(1):25-26.
- Belonogova VD, Korepanova NS, Oleshko GI, Nazarenko PV, Mukhamedzhanova DM. Some aspects of the study of biologically active substances and pharmacological properties of the medicinal plants. *Questions of biol. medicine and pharmaceutical chemistry*. 2003;(4):16-20.
- Boychuk SV, Shaimardanov RS, Minnebaev MM, Valeeva IC, Mustafin IG, Sharafislamov IF et al. Necrosis and apoptosis of hepatocytes and evaluation of some biochemical parameters of blood in patients with obstructive jaundice tumor etiology. *Russian journal of gastroenterology, hepatology and coloproctology*. 2007;17(6):32-36.
- Gerasimov AN. *Medical statistics: study guide*. Moscow: Medical inform. agency; 2007.
- Goykova LA, Zoryan EV, Anisimova EN, Gurevich KG. Pharmacological methods of correction of stress. *Questions of biol. medicine and pharmaceutical chemistry*. 2004;(3):3-5.
- Janashiya MM. *Antioxidants in physiological and pathological processes of organism*. St. Petersburg: Publ N-L; 2001.
- Kamyshnikov VS. *Handbook of clinical and biochemical studies and laboratory diagnosis*. Moscow: MEDpress Inform; 2009.
- Lukashina TV, Mineeva MF, Dubinskaya VA, Strelkova LB, Kolhir VK, Sokolskaya TA. Using specific enzymatic test systems in vitro for development of multicomponent drug Stabinorm. *Questions of biol. medicine and pharmaceutical chemistry*. 2007;(4):25-30.
- Makarov VG, Makarova NM, Selezneva AI. Study of the mechanism of antioxidant action of vitamins and flavonoids. *Problems of nutrition*. 2005;74 (1):10-13.
- Maltseva EL, Gurevich KG, Palmina NP. Possible

- mechanism of bimodal action of α -tocopherol to proteinkinase activity in vitro. Questions of biol. medicine and pharmaceutical chemistry. 2003;(4):44-48.
13. Mashkovskii MD. Medicines. Moskow: Novaya volna; 2001.
14. Menshchikova EB. Oxidative stress: the pathological conditions and diseases. Novosibirsk: ARTA; 2008.
15. Zaichik AS, Churilov LP. Patochemistry (endocrine and metabolic disorders). St. Petersburg: ELBI-SPb; 2007.
16. Zaitsev VG, Zakrevskii VI. Modeling of lipid peroxidation in vitro. Application of dinitrophenylhydrazine to assess the intensity of peroxidation of phosphatidyl choline liposomes. Vestnik of Volgograd Medical Academy. 2000;56(6):130-133.

*Кубан. гос. мед. ун-т, Краснодар, Россия;
Ин-т иммунофизиологии, Москва, Россия
E-mail: IlyaMB@ksma.ru*

*Материал поступил в
редакцию 13.11.2012*