

ORIGINAL ARTICLE

**INHIBITION OF THE LIPID OXIDATION PROCESSES BY THE
KAZAKHSTANI-SOIL ENDEMIC PLANTS**

Mashentseva A.A., Seitembetov T.S., Kazbekova A.T., Seitembetova A.J.,
Yushina L.V.

The L.N. Gumilev Eurasian national university, 01000, Astana, Munaitpasov str, 5 Kazakhstan

The Medical university of Astana, 01000, Astana, Beybitshilyk str, 49 Kazakhstan

Tel: (717-2) 53-95-37

E-mail: mashetseva@gmail.com

Received October 27, 2009

Phospholipids (PL) are universal components of cell membranes. They can be used as objective indices of normal or pathological organism states. The changing nature of the quantitative composition of PL is indicating the intensity of oxidative stress as well as the efficiency of exogenous plant antioxidants.

The PL dynamics of the ischemia in experimental rat's was investigated. The change of that parameter using the preventive injection of some vegetation organs of Kazakhstan birch extract.

The extracts of the birch vegetation organs in experimental group were dosed in the amount of 5 mg/kg. In order to investigate PL dynamics, the tissues of brain, liver, and kidney have been studied.

In order to estimate the PL change range in rat homogenate, the correlation between neutral and acid PL. Despite the fact that the amount of acid PL in the bio-membranes is less than the neutral ones, the latter regulate membrane functions in a higher degree.

It has been found that the rats which had experienced ischemia have a decreased amount of acid PL in the homogenates. Preventive injection of birch extracts brings about normalization of PL level. This fact points out a possibility of applying extracts of *Betula Pendula Roth* in order to regulate the PL level of experimental rats as well as an estimation of the antioxidant effect of exogenous substances.

key words: oxidation stress/Lipid peroxidation/ antioxidants/ Betula pendula Roth./ Populus balsamifera L.

ORIGINAL ARTICLE

ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ РАСТИТЕЛЬНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ ЭНДЕМИЧНЫХ РАСТЕНИЙ КАЗАХСТАНА

Машенцева А.А., Сейтеббетов Т.С., Казбекова А.Т., Сейтеббетова А.Ж.,

Юшина Л.В.

Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, 010000 г. Астана, ул. Мунайтпасова, 5 Казахстан

АО «Медицинский университет «Астана», 010000 г. Астана, ул. Бейбитшилик, 49 Казахстан

Tel: (717-2) 53-95-37

E-mail: mashetseva@gmail.com

Поступила в редакцию 27 октября 2009

Фосфолипиды (ФЛ) могут выступать объективным показателем статуса организма в норме и патологии. Характер изменения количественного изменения указывает как на тяжесть окислительного стресса, так и на эффективность действия экзогенных антиоксидантов (АО) растительного происхождения.

Изучена динамика ФЛ при ишемии лабораторных крыс и характер изменения этого показателя при превентивном введении экстрактов почек тополя бальзамического, вегетативных органов (почки, сережки) березы повислой, широко распространенных в Казахстане, а также тритерпеноида бетулина.

Ишемия крыс вызывалась механической асфиксией в течение 5 минут с последующей реанимацией. В опытной группе животных вводили экстракты вегетативных органов березы в дозе 5 мг/кг. Для изучения динамики ФЛ исследованы ткани мозга, печени и почек.

С целью изучения спектра ФЛ в гомогенатах лабораторных крыс исследовано изменение соотношения нейтральных и кислых ФЛ. Несмотря на то, что кислых ФЛ в биомембранах меньше чем нейтральных, они в большей степени регулируют функцию мембран.

Установлено, что у крыс, перенесших ишемию, наблюдается уменьшение содержания кислых ФЛ в гомогенатах, а превентивное введение экстрактов березы приводит к нормализации уровня ФЛ. Данный факт указывает на возможность применения экстрактов вегетативных органов березы для регулирования фосфолипидного статуса органов лабораторных крыс, а также оценки антиоксидантного эффекта экзогенных веществ.

key words: окислительный стресс/ ПОЛ/ антиоксиданты/ Betula pendula Roth./ Populus balsamifera L.

Свободно радикальные процессы с участием активных форм кислорода (АФК) являются основной жизнедеятельности аэробных организмов и, в

то же время, источником постоянной опасности, связанной с самопроизвольным окислением эндогенных макромолекул радикальными и пере-

кислыми продуктами окислительного метаболизма.

Известно, что избыточное количество в организме АФК, в частности свободных радикалов, вызывает усиление процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), сопровождающихся рядом патологических изменений в свойствах и функционировании клеток (Сорокина, Крысин, 1997). Однако при определенных условиях возникают неферментативные реакции одноэлектронного восстановления кислорода, образующие его анион-радикал (супероксид), а затем и другие радикальные и перекисные соединения. Факторами, влияющими на образование в организме радикальных производных кислорода могут быть загрязнение пищи, воздуха, продукты метаболизма некоторых лекарственных препаратов (цито- и туберкулостатики, антрациклиновые антибиотики, хлорсил и т. д.) (Барабой, Брехман, 1992). Взаимодействуя с эндогенными органическими молекулами, реакционно-активные радикалы и перекиси способствуют их аутоокислению, которое в организме чаще всего принимает форму перекисного окисления. Такие реакции легко протекают в клеточной и внеклеточной среде. Молекулы липидов, имеющие в своем составе легкоокисляющиеся ненасыщенные жирные кислоты, становятся мишенью окислительной атаки свободных радикалов и перекисей, поэтому ПОЛ является одним из наиболее распространенных видов свободно-радикальных процессов в организме.

Введение в реакционную среду экзогенных АО способствует обрыву цепи с образованием более стабильного и менее вредоносного радикала. Экзогенные фенольные антиоксиданты занимают ключевое положение в регулировании процессов функционирования антиоксидантной системы организма. Прежде всего, это связано с тем, что они контролируют целостность и функциональную активность важнейших клеточных структур - мембран. Необходимо отметить, что фенольные

антиоксиданты являются главными восстановителями гидроксил радикала – наиболее реакционно-активного продукта перекисного окисления (Меньшикова, 2006). Следовательно, лекарственные препараты и биологически активные добавки, содержащие в составе соединения полифенольной природы, являются наиболее эффективным средством борьбы и с избытком частиц радикального происхождения в организме. При этом АОА растительного происхождения обладают комплексным действием и одновременно мягким воздействием на организм и, следовательно, низкой токсичностью, в то время как синтетические АО могут проявлять побочные действия. Однако широкое практическое использование фитоантиоксидантов в качестве средств антиоксидантной терапии требует тщательного предварительного изучения их антиоксидантной эффективности как *in vivo* так и *in vitro*.

В работе нами выполнено исследование влияния экзогенных АОА растительного происхождения на динамику изменения состава ФЛ, относящихся к универсальным компонентам клеточных мембран, которые могут выступать объективным показателем статуса организма в норме и патологии. В качестве объектов исследования были выбраны экстракты эндемичных растений Казахстана – *Betula pendula* Roth. (береза повислая) и *Populus Balsamifera* L. (тополь бальзамический), произрастающих в Северном Казахстане (Поляков, Адекенов, 1999; Исаева, Ложкина, 2008; Куркин, Запесочная, 1990).

На основании полученных ранее данных о биологической активности исследуемых растительных экстрактов в эксперименте *in vitro* представлялось интересным изучение их влияния на ингибирование ПОЛ в эксперименте *in vivo*. В качестве стандартного вещества сравнения был использован витамин Е.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приготовление растительных экстрактов.

Растительные экстракты получены в Северо-Казахстанском Государственном Университете им. М. Козыбаева. Сырье исследовали по схеме исчерпывающего экстрагирования в аппарате Сокслета последовательно растворителями с повышающимся градиентом полярности: петролейный эфир, этилацетат, этиловый спирт.

Животные:

Эксперименты проводились на белых беспородных крысах массой 180 – 200 г. Животные содержались в пластиковых клетках при соответствующей температуре и нормальным световым циклом, получали стандартную пищу и воду в свободном доступе. Все животные были разделены на следующие группы: интактная, контрольная (крысы, подвергнутые острой гипоксии), опытные группы – крысы после острой гипоксии, получавшие в течение 20 дней экстракт почек и сережек березы, почек тополя, растворы витамина Е и бетулина.

Моделирование острой гипоксии.

Модель острой гипоксии (Лысенков, Корпачев, 1982) проводили путем механического удушья продолжительностью 5 минут, предварительно интубировав трахею для реанимации после клинической смерти. Оставляли на 1 час, после чего производили забор органов (печень, почки, мозг).

Определение фосфолипидного спектра исследуемых органов крыс

Экстракцию липидов проводили по методу Фолча. Фракционирование фосфолипидов производили на предметных стеклах методом тонкослойной хроматографии на силикагеле. Идентификацию фракций проводили по известным значениям с использованием стандартов, а также

цветных тестов. Распределение ФЛ в порядке возрастания подвижности было следующим: на старте оставалась фракция α -глицерофосфата (ГФ), лизофосфатидилхолин (ЛФХ), фосфатидилсерин (ФС), сфингомиелин (СФМ), фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭА), полиглицерофосфатиды (ПГФ), фосфатидные кислоты (ФК).

Количественное содержание фосфора в отдельных фракциях производили с реактивом малахитовый зеленый (Грибанов, Базанов, 1976).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические мембраны наряду с элементами цитоскелета формируют ультраструктуру животной клетки, а также выполняют ряд функций, нарушение любой из которых может привести к изменению жизнедеятельности клетки в целом и даже к ее гибели. Наиболее тяжелые последствия вызывает повреждение липидного слоя мембран. Липидный слой клеточной и внутриклеточных мембран выполняет две основные функции - барьерную и матричную (структурную). Повреждение барьера приводит к нарушению регуляции внутриклеточных процессов и тяжелым расстройствам клеточных функций. Липидный слой мембран формирует в клетке особую жидкую фазу.

ФЛ могут рассматриваться в качестве динамических компонентов, обеспечивающих стабильность мембран. Решающее значение для поддержания функционирования мембран в условиях окислительного стресса играет количественное соотношение кислых и нейтральных фосфолипидов. Несмотря на то, что кислых ФЛ в биомембранах меньше чем нейтральных, они в большей степени регулируют функции клеточных мембран. Структура и состав клеточных мембран является важным фактором, определяющим скорость свободнорадикального окисления липидов, изменения активности антиоксидантной системы, активации сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. Для оценки изменения спектра ФЛ в гомогенатах ла-

бораторных крыс исследовано изменение соотношения нейтральных и кислых ФЛ.

Нейтральные ФЛ являются цитоскелетом, а кислые ФЛ необходимы для поддержания активности мембраносвязанных ферментов. Химический состав липидов подобран таким образом, чтобы оптимизировать выполнение клеточных функций. Вследствие этого, модификация липидного компонента при действии повреждающих факторов может, как поддерживать клеточные функции (компенсаторно-приспособительная реакция), так и провоцировать развитие патологического процесса (Курашвили, Васильков, 2003). Сдвиги в химическом составе липидов мембраны, вызванные развитием цепной реакции перекисления, влекут за собой нарушение ее регуляторных функций в отношении важнейших процессов клеточного метаболизма. Это выражается в инактивации ферментов, изменении проницаемости мембран для биологически активных молекул, что может завершиться деструкцией мембран и гибелью клетки.

На основании вышесказанного весьма интересным является изучение состава липидов в ткани печени крыс при экспериментальной острой гипоксии и действии антиоксидантов с целью выявления роли липидных модификаций в развитии патологического процесса.

ФЛ тканей печени наиболее широко представлены ФХ и ФЭА, на долю ЛФХ и ПГФ приходится примерно одинаковое количество. Анализ полученных данных об изменении соотношения фракций ФЛ в гомогенатах печени исследуемых лабораторных животных выявил основные фракции ФЛ: СФМ, ФХ и ФЭА. В динамике постреанимационного периода у крыс, перенесших клиническую смерть, отмечены существенные изменения указанных фракций ФЛ. Так, резкое уменьшение количества фракции СФМ практически в

10 раз по сравнению с интактной группой с $27,31 \pm 2,12$ до $2,27 \pm 0,56$ у контрольной группы животных может быть объяснено увеличением кислых ФЛ –ПГФ на 47% ($P < 0,01$) и ФК на 20% ($P < 0,05$). Липоперекиси, образующиеся в процессе ПОЛ, весьма нестабильны и уже при комнатной температуре распадаются с образованием альдегидов, которые в дальнейшем окисляются в кислоты. Графически изменение фосфолипидного состава тканей печени экспериментальных животных продемонстрировано на рисунке 1.

Необходимо отметить достаточно высокую АОА экстрактов сережек и почек березы по отношению к контрольной группе сопоставимое с аналогичным эффектом широко известного антиоксиданта витамина Е. Входящие в состав вышеуказанных суммарных экстрактов флавоноиды и их гликозиды обеспечивают высокую ингибирующую активность за счет нейтрализации АФК.

Высокая реакционная способность жирорастворимого витамина Е по отношению к свободным радикалам обеспечивается за счет стереоэлектронного эффекта хромановой структуры, которая стабилизирует феноксильный радикал. Согласно гипотезе об эстафетной модели ПОЛ в мембранах, антирадикальное действие антиоксидантов с боковой углеводородной цепью осуществляется путем передачи радикального центра с липида на углеводородную цепь антиоксиданта с последующим перемещением его в направлении полярной части молекулы ингибитора. Хвостовой фрагмент служит своеобразным каналом удаления радикалов из углеводородной зоны мембраны. Можно предположить аналогичный эффект и у тритерпеноида бетулина. Механизм взаимодействия бетулина с частицами радикальной природы до сих пор является малоизученным, по-видимому, молекулы бетулина восстанавливают структуру поврежденных биологических мембран по принципу «латания дыр».

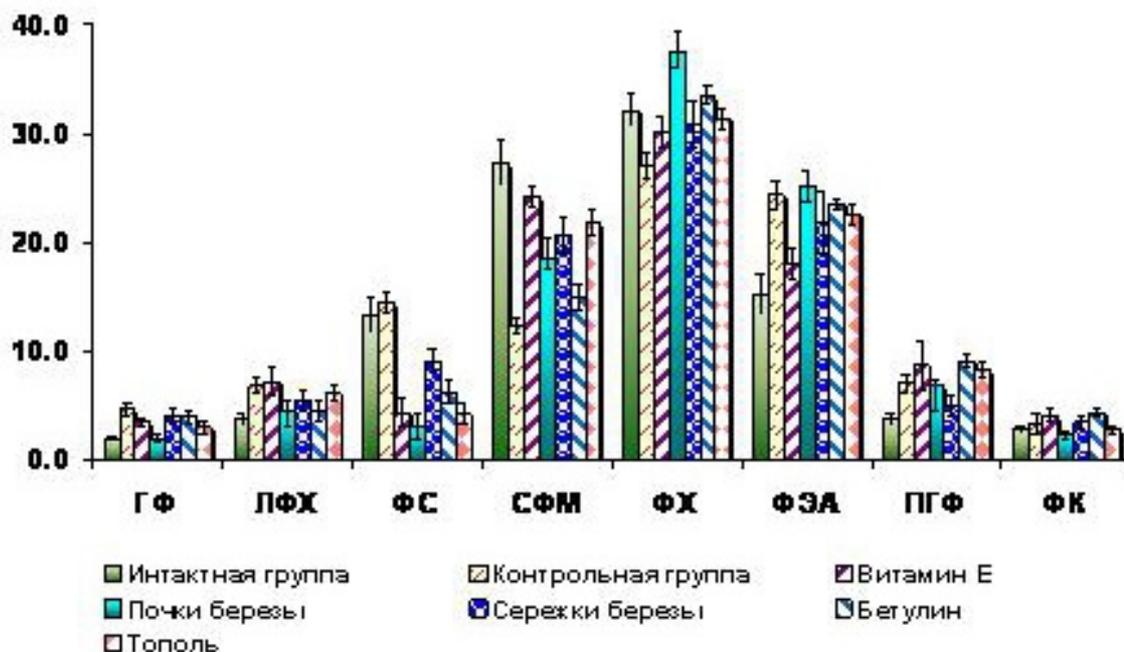


Рисунок 1. Динамика изменения состава ФЛ в печени

Таблица 1. Значения информационной энтропии в ткани мозга экспериментальных животных

	Почки	Печень	Мозг
Интактная группа	2,52	2,43	2,19
Контрольная группа	2,66	2,69	2,58
Витамин Е	2,53	2,59	2,40
Почки березы	2,48	2,34	2,37
Сережки березы	2,59	2,58	2,50
Почки тополя	2,44	2,52	2,43
Бетулин	2,8	2,57	2,56

Известно, что постреанимационный период характеризуется повышением проницаемости биологических мембран органов и тканей под влиянием лизосомальных ферментов в период острой гипоксии. Можно предположить, что процесс восстановления характеризуется повышением степени гидратации мозговых структур с последующим изменением функционирования мембран клеток мозга. Увеличение степени гидратации приводит к деформации липидных молекул, изменению в связи с этим взаимоотношений между

компонентами мембран мозговых клеток и сдвигом функций последних.

Изменение количества ФЛ фракций в тканях мозга экспериментальных животных наглядно иллюстрирует динамику влияния растительных экстрактов на степень протекания ПОЛ. Фракция СФМ наиболее четко показывает изменение количественного состава ФЛ. Так, если данный показатель у интактной группы составляет $17,22 \pm 0,70$, то у группы животных, перенесших острую гипоксию составляет $24,3 \pm 0,63$ ($P < 0,01$). При этом в группах опытных, принимавших

витамин Е и экстракт сережек березы повислой и бетулин, наблюдается значительное уменьшение количества фосфолипидной фракции СФМ. Максимально по своему значению к показателям интактной группы приближены значения СФМ бетулина $19,39 \pm 1,13$ ($P < 0,001$).

При усилении ПОЛ тканей мозга индивидуальный спектр фосфолипидов изменялся так, что мембраны клеток обеднялись легко окисляемыми фракциями – ФС, ПГФ и обогащались ФХ и СФМ, более устойчивых к окислению.

При использовании экстрактов вегетативных органов березы наблюдаются достоверные изменения в спектре липидов мозга крыс по сравнению с контролем. Так, содержание фракции ФС у контрольной группы уменьшается на 72,45% по отношению к интактной группе (норма), однако введение экстрактов почек и сережек березы корректирует данный показатель до 45,71% и 41,7% соответственно.

Установлено, что фракция ПГФ содержит в своем составе кардиолипиды, участвующий в активации ферментов переноса электронов на ряде этапов дыхательной цепи. А так как в ткани мозга и почках идет постоянное уменьшение полиглицерофосфатидов, то это также подтверждает, что острая гипоксия сопровождается нарушением тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования.

В стадии декомпенсации клеточные мембраны тканей мозга продолжают уплотняться, снижается жидкость клеточных мембран, усиливается разобщение тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования (Lambelet *et al.*, 1994). Процесс гипоксии служит основанием перехода клеток головного мозга на анаэробный путь получения энергии. Гипоксия и ишемия тканей мозга ведут к деполяризации нейрональных мембран, нарушению ионного гомеостаза в клетках и изменениям энергетического метаболизма, способствуя увеличению

энергетического дефицита.

Фракция ФХ является ингибитором перекисного окисления липидов. Снижение количества ФХ в контрольной группе по отношению к интактным животным с $31,31 \pm 1,21$ до $26,53 \pm 0,83$ ($P < 0,001$) позволяет предположить истощение антиоксидантной защиты в клетках ткани печени и почек. В опытных группах животных, принимавших экстракты почек и сережек березы повислой ФХ максимально приближено к аналогичному показателю в норме.

Увеличение количества ФЭА по отношению к интактной группе обусловлено уменьшением фракции ФС, как было сказано выше, ФС является предшественником синтеза ФЭА. Уменьшение в контрольной группе концентрации легко окисляемой фракции СФМ, имеющей в своем составе ненасыщенные и моноеновые кислоты, необходимых для устранения дефицита энергии, возникающего в тканях в результате гипоксии и компенсируется в опытных группах. Наилучший результат достигается в случае опытных животных, принимавших экстракты сережек и почек березы повислой.

В печени и почках за счет включения механизмов тканевой адаптации происходит переключение функциональных систем на дефицитное использование энергии с накоплением концентрации ионов водорода и молочной кислоты. Содержание ФК повышалось во всех тканях фосфатидные кислоты являются субстратом для индивидуальных фосфолипидов, т.е. только в клетках исследуемых тканей синтезировались ФЛ.

Основные фосфолипидные компоненты плазматической мембраны, содержащие в своем составе полиеновые жирные кислоты (ФЭА, ФХ), снижались только в тканях мозга и почек.

Полученные результаты позволяют утверждать, что нарушение функциональной активности тканей мозга, печени и почек при экстремальном состоянии острой гипоксии

возможно только после изменения соотношения в клетках фосфолипидов. В связи с чем повышается каталитическая активность мембранных белков. Нарушения в липидных компонентах клеток этих органов приводят к функциональной дезинтеграции, а затем к их гибели, если фактор агрессии не устранить или ослабить его воздействие введением антиоксидантов, ингибирующих процессы ПОЛ.

Резюмируя результаты проведенного исследования, отмечаем, что полученные нами данные позволяют оценить эффективность применения суммарных экстрактов эндемичных растений Казахстана в качестве ингибиторов ПОЛ. Однако наиболее четкие сведения об эффективности использования того или иного экстракта в разрезе экспериментальных групп возможно получить при учете информационных показателей, позволяющих оценивать направленность изменений в организме при воздействии различных факторов. В связи с этим изменение соотношения отдельных фракций ФЛ нами объясняется с позиции изменения информационной энтропии (ИЭ). Согласно теории ИЭ любые изменения равнозначных показателей, составляющих одно целое (фракции ФЛ), отражают состояние изучаемой системы. Учет энтропии системы и изменения ее в динамике тех или иных процессов позволяет выяснить упорядоченность или дезорганизацию системы.

Нами проведен анализ изменения энтропии в коре головного мозга, почках и печени крыс, перенесших клиническую смерть и последующую реабилитацию. В таблице 1 приведены данные изменений показателя патологического рассредоточения в системе - ИЭ.

Анализ представленных в таблице 1 данных свидетельствует о наличии возрастания информационной энтропии, как индикатора усиления патологического процесса. Так, рост показателя ИЭ всех органов контрольной группы

животных указывает на патологию животных, перенесших клиническую смерть. В опытных группах животных значения ИЭ во всех случаях применения растительных экстрактов меньше аналогичных показателей контрольной группы.

На основании данных об изменении ИЭ можно предполагать, что экстракт почек березы оказывает наиболее благоприятный эффект на мозг, почки и печень. В результате липидного обмена при окислительном стрессе нормализуется баланс кислых и нейтральных фосфолипидных компонентов клеточных мембран. Применение экстрактов сережек березы повислой, а также тополя бальзамического также оказывает положительный эффект на ингибирование ПОЛ в тканях почек. Бетулин, проявляющий схожий с витамином Е механизм антиоксидантного действия, имеет эквивалентные значения со стандартным веществом ИЭ в тканях печени. Но в тканях почек в присутствии бетулина ИЭ указывает на ухудшение патологического процесса, что может быть непосредственно связано как с функциональными особенностями каждого органа, так и с химическим составом входящих компонентов.

Пероксидация липидного бислоя мембран, как ведущего механизма нарушения жизнедеятельности клеток, реализуется в развитии патологического состояния на уровне целого организма. Использование АО на основе растительных экстрактов эндемичных растений Северного Казахстана благоприятно влияет на процессы ингибирования окислительного воздействия активных форм кислорода в живых организмах.

Список литературы:

Барабой В.А., Брехман И.И. и др. Перекисное окисление и стресс. – СПб.: Наука. 1992. – 148 с.

- Грибанов Г.А., Базанов Г.А. Модификация ультрамикроределения общего и неорганического фосфора с помощью малахитового зеленого//Лабораторное дело. 1976. № 9. С. 527 – 530.
- Исаева Е.В., Ложкина Г.А. и др. Флавоноиды почек тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.), произрастающего в Красноярске. С.1. Флавоноиды этилацетатного экстракта почек тополя бальзамического// Химия растительного сырья. 2008. №2. С. 47–53.
- Куркин В.А., Запесочная Г.Г. и др. Флавоноиды почек *Populus balsamifera* L. // Химия природных соединений. 1990. №2. С. 272–273.
- Курашвили Л.В., Васильков В.Г. Липидный обмен при неотложных состояниях. - Пенза. 2003 - 198 с.
- Лысенков С.П., Корпачев В.Г. и др. Балльная оценка общего состояния крыс, перенесших клиническую смерть // Клиника, патогенез и лечение неотложных состояний: Науч. труды. Новосибирск. 1982. С. 8–13.
- Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. -М.: Слово. 2006. 556 с.
- Поляков В.В., Адекенов С. М. Биологически активные соединения растений рода *Populus* L. и препараты на их основе. — Алматы: Гылым. 1999. -160 с.
- Сорокина И.В., Крысин А.П. и др. Роль фенольных антиоксидантов в повышении устойчивости органических систем к свободно-радикальному окислению. Аналитический обзор. – Новосибирск. 1997. – 68 с.
- Lambelet P.; Saucy F. et al Radical Exchange Reactions between Vitamin E, Vitamin C and Phospholipids in Autoxidizing Polyunsaturated Lipids// Free Rad. Res. 1994. Vol. 20. Issue 1. P. 1 – 10.