

МЕХАНИЗМЫ КОРРЕКЦИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА АНТИОКСИДАНТАМИ ИЗ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ ПРИ АЛИМЕНТАРНЫХ ДИСЛИПИДЕМИЯХ

Вера Иннокентьевна ЯНЬКОВА¹, Вера Васильевна КНЫШОВА¹, Вадим Зиновьевич ЛАНКИН²

¹Владивостокский филиал ДНЦ ФПД СО РАМН – НИИ МКВЛ
690105, г. Владивосток, ул. Русская, 73г

²Институт клинической кардиологии им. А.Л. Мясникова,
ФГУ Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росздрава
121552, г. Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

Представлены результаты, подтверждающие эффективность применения комплексов, содержащих биологически активные субстанции из морских гидробионтов, для коррекции дисбаланса между прооксидантными и антиоксидантными процессами при алиментарных дислипидемиях у экспериментальных животных. Обсуждаются возможные механизмы регуляции окислительного стресса антиоксидантами из морских гидробионтов.

Ключевые слова: окислительный стресс, дислипидемия, антиоксиданты.

Течение многих заболеваний и патологических процессов сопровождается нарушением окислительно-восстановительного баланса в организме. Для описания дисбаланса в системе «прооксиданты – антиоксиданты» в последние годы стал применяться термин «окислительный стресс», который позволяет описывать состояния, наблюдаемые в клетках, тканях и в целом организме [1]. Проблема изучения клеточно-молекулярных механизмов развития и коррекции окислительного стресса является необычайно актуальной, так как затрагивает большое число патологических состояний [1], в том числе и сопровождающихся нарушениями липидного статуса организма – дислипидемиями (ДЛП). Развитие алиментарной ДЛП характеризуется системными изменениями метаболизма липидов в сыворотке крови, в печени как в органе-мишени [2] и сопровождается активацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [3].

В настоящей статье представлены результаты изучения механизмов антиоксидантного действия комплексов, содержащих биологически активные субстанции из морских гидробионтов, их эффективности при коррекции окислительного стресса у экспериментальных животных с моделями алиментарных дислипидемий.

Материалы и методы

Исследования проведены на 42 половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г, у которых воспроизводили модели алиментарных ДЛП, вызванные холестериновой нагрузкой и разбалансированными по составу жиров и угле-

водов рационами питания. Содержание животных в виварии соответствовало «Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник» от 06.04.1993. Исследования осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ и использования экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). Эвтаназию животных проводили путем декапитации под легким эфирным наркозом.

Развитие 1-й модели алиментарной ДЛП осуществляли по модифицированной авторами методике А. Koichi [4]: крысы-самцы в течение 11 недель находились на основном рационе, обогащенном холестерином (2 % от массы рациона), свиным салом (10 %), сахаром (5 %) и холевой кислотой (0,5 %). 2-я модель алиментарной ДЛП воспроизводилась в течение 4-х недель путем увеличения в составе основного рациона питания животных доли холестерина (2,5 % от массы рациона) и сливочного масла (25 %) [5].

Оценка состояния системы пероксидации липидов проводилась по содержанию в ткани печени продуктов пероксидации липидов – диеновых конъюгатов (ДК) [6], малонового диальдегида (МДА) [7], Шиффовых оснований (ШО) [8]; системы антиоксидантной защиты (АОЗ) – по уровню низкомолекулярных антиоксидантов α -токоферола (витамин Е) и ретинола (витамин А) [9, 10], показателей глутатионзависимого звена антиоксидантной защиты – восстановленного глутатиона (ГЛ) [11], активности ферментов глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР) [12].

Янькова В.И. – канд.б.н., доцент, ученый секретарь, e-mail: jankova_nch@list.ru

Кнышова В.В. – канд.м.н., старш.н.с. лаборатории восстановительного лечения

Ланкин В.З. – д.б.н., проф., зав. лабораторией свободнорадикальных процессов

Для коррекции окислительного стресса у крыс с 1-й моделью алиментарной ДЛП использовали эхинохром, выделенный из морских ежей, в виде композиции с медом для улучшения органолептических свойств и повышения биодоступности при пероральном использовании (разработана в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН). Данную композицию вводили интрагастрально в дозе 0,25 мг/кг массы животного. Курсовая доза действующего вещества (эхинохром) составила 2,5 мг/кг массы животного. Курс введения – 10 дней.

Коррекция окислительного стресса при алиментарной ДЛП (2-я модель) осуществлялась при помощи композиции белково-полисахаридного комплекса, выделенного из трепанга *Apostichopus japonicus*, и модифицированного цитрусового пектина (разработана ООО «Ковчег-ПП»). Белковая часть комплекса представлена 8-ю белками, доминирующим из которых является белок с молекулярной массой 120 кДа. Основная структурная единица полисахаридной части комплекса – нейраминовая кислота. Введение пищевой композиции осуществляли ежедневно интрагастрально до

кормления через зонд из расчета 7 мг/кг массы тела крысы. Курс введения составил 35 дней.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, m – ошибка среднего арифметического значения. Различия между группами оценивали с помощью непараметрического критерия серий Вальда – Вольфовица для независимых выборок, различающихся не только средними значениями, но и формой распределения.

Результаты и обсуждение

Алиментарные ДЛП сопровождались развитием окислительного стресса (табл. 1), проявляющегося нарушением физиологического баланса между интенсивностью свободнорадикального окисления липидов и функциональной активностью антиоксидантной системы.

Об усилении активности процессов ПОЛ в печени свидетельствовало статистически значимое ($p = 0,002$) увеличение содержания продуктов окисления липидов на всех стадиях перекисного каскада: первичных и конечных продуктов (ДК, МДА, ШО)

Таблица 1

Показатели пероксидации липидов и антиоксидантной защиты в печени животных при алиментарных дислипидемиях

Показатель	Алиментарная ДЛП (1-я модель)		Алиментарная ДЛП (2-я модель)	
	Контрольная группа, n = 7	Опытная группа, n = 7	Контрольная группа, n = 7	Опытная группа, n = 7
Содержание ДК, нмоль/мг липидов	4,95 ± 0,08	9,66 ± 0,25**	3,71 ± 0,24	9,34 ± 0,23**
Содержание МДА, нмоль/мг белка	1,77 ± 0,09	4,76 ± 0,22**	2,07 ± 0,06	4,66 ± 0,15**
Содержание ШО, у.е./мг липидов	16,80 ± 0,58	25,00 ± 0,77**	11,26 ± 0,33	17,62 ± 0,34**
Содержание ГЛ, мкг/мг белка	19,15 ± 0,32	13,17 ± 0,33**	8,03 ± 0,12	4,96 ± 0,11**
Активность ГР, нмоль НАДФН/(мин × мг белка)	1,79 ± 0,14	0,77 ± 0,04**	1,64 ± 0,10	1,12 ± 0,04**
Активность ГП, нмоль ГЛ/(мин × мг белка)	1,27 ± 0,03	0,93 ± 0,02**	0,91 ± 0,02	0,75 ± 0,05*
Содержание α-токоферола, нг/мг липидов	173,15 ± 4,06	67,50 ± 2,30**	233,6 ± 8,13	176,75 ± 5,18**
Содержание витамина А, нг/мг липидов	71,05 ± 2,78	54,40 ± 2,73**	87,04 ± 1,99	78,35 ± 4,87

Примечание: отличие от контрольной группы достоверно: * – при $p = 0,05$; ** – при $p = 0,002$.

у животных с 1-й моделью ДЛП на 95, 169, 48 % и у животных со 2-й моделью ДЛП на 152 %, 125 %, 56 % соответственно по сравнению с животными контрольных групп. Интенсификация процессов ПОЛ в печени крыс имела особенности в зависимости от состава атерогенной диеты, используемой для развития алиментарных ДЛП. Следует отметить, что у крыс со 2-й моделью алиментарной ДЛП процессы ПОЛ протекали наиболее интенсивно на стадии образования первичных продуктов, о чем свидетельствовало значительное увеличение количества ДК, т. к. обнаружение диеновой конъюгации в биологических мембранах является чувствительным тестом на появление гидроперекисей липидов [13]. У животных с 1-й моделью ДЛП максимальная активация процессов ПОЛ осуществлялась на стадии образования конечного продукта – МДА и ШО, являющихся продуктами последующей конденсации МДА с различными аминопроизводными субстратами. Данный факт подтверждался суммарным изменением этих показателей у особей с 1-й моделью ДЛП (217 %), превышающим на 36 % соответствующий показатель у животных со 2-й моделью ДЛП (181 %).

Отмечаемое при ДЛП (1-я модель) угнетение ферментативного глутатионзависимого звена АОЗ выражалось в снижении активности ГП на 26 % ($p = 0,002$) и ГР на 57 % ($p = 0,002$), обуславливающих понижение в ткани печени пула восстановленного ГЛ на 31 % ($p = 0,002$). Уменьшение содержания низкомолекулярных антиоксидантов – витаминов Е

на 61 % ($p = 0,002$) и А на 23 % ($p = 0,002$) – свидетельствовало об истощении резервов АОЗ в печени в ответ на усиление ПОЛ. При ДЛП, индуцированной 2-м рационом, в ткани печени крыс изменения активности глутатионзависимых ферментов были менее выражены по сравнению с крысами, находящимися на 1-м экспериментальном рационе: активность ГП снижалась на 17 % ($p = 0,05$) и ГР на 32 % ($p = 0,002$), что приводило к снижению резерва глутатиона в качестве восстановительного эквивалента на 38 % ($p = 0,002$). При этом в печени животных уменьшалось содержание только α -токоферола (на 24 %, $p = 0,002$) при сохранении концентрации витамина А на уровне данного показателя у крыс контрольной группы.

При развитии окислительного стресса у животных с 1-й моделью алиментарной ДЛП наблюдался наиболее выраженный редокс-дисбаланс, сопровождающийся более высокой интенсивностью процессов ПОЛ с преимущественным образованием конечных продуктов и более глубоким угнетением антиоксидантной защиты на уровне редокс-системы глутатиона и низкомолекулярных антиоксидантов. Поэтому при выборе средства для коррекции наиболее выраженных нарушений в системе «ПОЛ – АОЗ» у крыс в условиях окислительного стресса, по-нашему мнению, предпочтительно было использовать композицию эхинохрома с медом, антиоксидантное действие которой обусловлено присутствием активного начала – 2,3,5,6,8-пентагидрокси-7-этил-1,4-нафтохинона

Таблица 2

Показатели системы «ПОЛ – АОЗ» в печени крыс с алиментарными ДЛП после введения антиоксидантов морского происхождения

Показатель	Алиментарная ДЛП (1-я модель) + композиция эхинохрома и меда, $n = 7$	Алиментарная ДЛП (2-я модель) + композиция белково-полисахаридного комплекса и цитрусового пектина, $n = 7$
Содержание ДК, нмоль/мг липидов	71 %**	74 %*
Содержание МДА, нмоль/мг липидов	67 %**	60 %*
Содержание ШО, у.е./мг липидов	72 %**	76 %*
Содержание ГЛ, мкг/мг белка	135 %**	109 %
Активность ГП, нмоль ГЛ/(мин \times мг белка)	116 %**	101 %
Активность ГР, нмоль НАДФН/(мин \times мг белка)	145 %**	133 %*
Содержание α -токоферола, нг/мг липидов	144 %**	106 %
Содержание витамина А, нг/мг липидов	116 %	98 %

Примечание: за 100 % принято значение показателя у крыс с моделью ДЛП; изменение значимо:

* – при $p = 0,004$, ** – при $p = 0,002$.

(эхинохром), относящегося к классу водорастворимых антиоксидантов — полигидроксинафтохинонам.

Коррекция окислительного стресса при действии данной композиции у крыс с алиментарной ДЛП (1-я модель) сопровождалась увеличением в ткани печени активности ГП (на 16 %, $p = 0,002$), катализирующей процесс удаления гидроперекисей липидов с участием в качестве восстановительного эквивалента эндогенного глутатиона (табл. 2).

Удаление липопероксидов предотвращает разветвление цепей и тем самым резко тормозит процесс свободнорадикального окисления (СРО) липидов, что подтверждалось достоверным ($p = 0,002$) уменьшением содержания конечного продукта ПОЛ – МДА на 33 %, а также вторичных продуктов взаимодействия МДА с различными аминопроизводными – ШО – на 28 %. Значительное увеличение активности фермента ГР (на 45 %, $p = 0,002$), принимающего участие в восстановлении окисленного ГЛ, приводило к повышению содержания восстановленной формы ГЛ в печени крыс на 35 % ($p = 0,002$). Возраста-

ние содержания α -токоферола (на 44 %) в печени экспериментальных животных, по-видимому, связано со снижением его потребления для инактивации перекисных радикалов липидов в результате конкурентного участия в данном процессе эхинохрома.

Механизмы антиоксидантного действия эхинохрома имеют двойственную природу и обусловлены способностью полигидроксинафтохинонов, с одной стороны, перехватывать свободные радикалы, возникающие при перекисном окислении мембранных липидов, с другой – тормозить Fe^{2+} -индуцированное окисление липидов в результате связывания прооксиданта (катионы двухвалентного железа) в малоактивный комплекс [14]. Эхинохром стимулирует антирадикальную и антиперекисную линии защиты.

Полученные нами результаты свидетельствовали, что активация антиперекисной линии АОЗ может происходить также за счет восстановления глутатионом пероксидов липидов в присутствии глутатиопероксидазы и глутатионредуктазы, осуществляющей регенерацию окисленного глутатиона в восстановленный (рис.).



Антиоксидантные свойства пищевой композиции из трепанга и пектина, проявляющиеся в ингибировании процессов ПОЛ в печени крыс при алиментарной ДЛП (2-я модель), характеризовались статистически значимым ($p = 0.004$) уменьшением содержания всех продуктов ПОЛ: МДА (на 40 %), ДК (на 26 %) и ШО (на 24 %) (табл. 2). Это связано, по-видимому, с активацией первой линии АОЗ — «антикислородной», осуществляющей детоксикацию активных форм кислорода ферментами супероксиддисмутазой, каталазой, т. к. большинство изученных нами показателей АОЗ сохраняли значения на уровне модели ДЛП (рис.). В пользу этого заключения свидетельствовал и тот факт, что при действии данной композиции, несмотря на сохраняющееся угнетение глутатионзависимого ферментативного звена АОЗ и истощение резерва низкомолекулярных антиоксидантов (витамины Е и А), наблюдался высокий уровень ингибирования ПОЛ, сопоставимый по интенсивности с действием композиции эхинохрома с медом, антиоксидантная активность которой осуществлялась на второй и третьей линиях защиты. Выявленная способность пищевой композиции из трепанга и пектина повышать активность ГР (на 33 %, $p = 0.002$) не компенсировала значительное угнетение активности этого фермента у крыс со 2-й моделью ДЛП, которая даже при коррекции окислительного стресса оставалась на достаточно низком уровне по сравнению с контрольной группой, что являлось недостаточным условием для нормализации работы редокс-системы глутатиона. В результате этого резерв восстановленного ГЛ оставался низким и не достигал физиологического уровня животных контрольной группы. Поскольку ГР является лимитирующим звеном в системе «глутатионредуктаза — глутатионпероксидаза», факт увеличения ее активности можно интерпретировать как стимуляцию третьей линии АОЗ — антиперекисной.

В составе данной композиции присутствует водорастворимый модифицированный цитрусовый пектин, относящийся к энтеросорбентам, которые по данным разных авторов нормализуют показатель СРО (МДА, ДК, гидроперекиси липидов и др.) при ишемических и острых воспалительных процессах [15], что связано, по-видимому, со способностью пищевых волокон сорбировать эндогенные цитотоксические вещества, к которым можно отнести и продукты ПОЛ.

Выводы

Композиция эхинохрома с медом эффективно препятствует развитию у крыс при алиментарной ДЛП окислительного стресса, действуя на второй — антирадикальной и третьей — антиперекисной линиях антиоксидантной защиты. Антирадикальное действие обусловлено содержанием растворимых полигидроксинафтохинонов, которые выступают в роли перехватчиков радикалов, тем самым способствуют обрыву цепи СРО липидов. Анти-

перекисная линия защиты осуществляется за счет удаления перекисей липидов, что резко тормозит процесс разветвления цепей ПОЛ.

Механизмы действия белково-полисахаридного комплекса из трепанга и модифицированного цитрусового пектина заключаются в активации первой линии АОЗ — антикислородной, сопровождающейся инактивацией активных форм кислорода за счет ферментов, что препятствует образованию гидроксил-радикала, инициирующего СРО липидов, а также в стимуляции третьей, антиперекисной, линии АОЗ и сорбции цитотоксических продуктов ПОЛ.

Использование композиций, содержащих биологически активные субстанции из морских гидробионтов, способствует коррекции окислительного стресса при алиментарных ДЛП. Механизмы и степень их корригирующего воздействия зависят от природы антиоксиданта, генеза ДЛП и степени дисбаланса между процессами пероксидации липидов и антиоксидантной защиты при окислительном стрессе.

Литература

1. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. и др. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
2. Menshikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z. et al. Oxidative stress: Pathological states and diseases. Novosibirsk: ARTA, 2008. 284 p.
3. Бувеева Е.Л., Дранкина О.М., Ивашкин В.Т. Атерогенная дислипидемия и печень // Рос. мед. вестн. 2008. 13. (1). 17–23.
4. Bueverova E.L., Drapkina O.M., Ivashkin V.T. Atherogenic dyslipidemia and the liver // Ros. med. vestn. 2008. 13. (1). 17–23.
5. Formenty B., Derson F., Pessayre D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation // Hepatology. 1997. 26. (suppl. 1). 13–22.
6. Koichi A., Kazuhisa F., Takhi O. Simultaneous occurrence of hypercholesterolemia and hemolytic anemia in rats fed cholesterol diet // Life Sci. 1986. 39. (6). 499–505.
7. Cole T.G., Kuish I., Patseh W., Sehonfeld G. Effects of high cholesterol diets on rat plasma lipoproteins and lipoprotein-cell interactions // J. Lipid Res. 1984. 25. (6). 593–603.
8. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. 64–66.
9. Stal'naya I.D. Diene conjugation of unsaturated higher fatty acids' evaluation method // Modern methods in biochemistry / Ed. V.N. Orekhovich. M.: Medicine, 1977. 64–66.
10. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тио-

барбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. 66–68.

Stal'naya I.D., Garishvili T.G. The method of determination of malondialdehyde by thiobarbituric acid // Modern methods in biochemistry / Ed. V.N. Orekhovich. M.: Medicine, 1977. 66–68.

8. Shimasaki H., Hirai N., Ueta N. Comparison of fluorescence characteristics of products of peroxidation of membrane phospholipids with those of products derived from reaction of malonaldehyde with glycine as a model of lipofuscin fluorescent substances // J. Biochem. 1988. 104. 761–766.

9. Bidlack W.R., Tappel A.L. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation // Lipids. 1973. 8. (4). 203–207.

10. Taylor S.L., Lamden M.P., Tappel A.L. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis // Lipids. 1976. 11. 530–538.

11. Moron M.S., Depierre J.W., Mannervik B. Levels of glutathione, glutathione-reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver // Biochim. Biophys. Acta. 1979. 582. 67–78.

12. Carlberg I., Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione

reductase from rat liver // J. Biol. Chem. 1975. 250. (14). 5475–5480.

13. Васильева Е.М. Перекисное окисление липидов в аорте нормотензивных и спонтанно гипертензивных крыс при сахарном диабете // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 1992. (5). 495–496.

Vasilyeva E.M. Lipids peroxidation in aorta of normotensive and spontaneous hypertensive rats in case of diabetes mellitus // Bull. eksperim. biologii i meditsiny. 1992. (5). 495–496.

14. Лебедев А.В., Бозулавская Л.В., Левицкий Д.О., Максимов О.Б. Механизмы ингибирования Fe^{2+} -индуцированного окисления фосфатидилхолинов полигидроксинафтахинонами // Биохимия. 1988. 53. (4). 598–603.

Lebedev A.V., Boguslavskaya L.V., Levitsky D.O., Maksimov O.B. Mechanisms of inhibition of phosphatidylcholines Fe^{2+} -induced oxidation by polyhydroxynaphthaquinones // Biokhimiya. 1988. 53. (4). 598–603.

15. Энтеросорбция / Под ред. Н.А. Белякова. Л., 1991. 336 с.

Enterosorption / Ed. N.A. Belyakov. L., 1991. 336 p.

OXIDATIVE STRESS CONTROL IN CASES OF ALIMENTARY DYSLIPIDEMIA BY ANTIOXIDANTS PRODUCED FROM MARINE HYDROBIONTS

Vera Innokent'yevna YAN'KOVA¹, Vera Vasilyevna KNYSHOVA¹, Vadim Zinovyevich LANKIN²

¹The Vladivostok department of the Far Eastern research center for physiology and respiratory pathology of SB RAMS – Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment
690105, Vladivostok, Russkaya st., 73g

²Research Institute of Clinical cardiology n.a. A.L. Myasnikov, Federal State Institution Russian Cardiological Research and Production complex of Roszdrav
121552, Moscow, 3-ya Cherepkovskaya st., 15a

The results were presented to evidence the effectiveness of administration of complexes contain biologically active essence produced from marine hydrobionts for pro-oxidant and anti-oxidant processes imbalance correction in case of alimentary dyslipidemias. The possible mechanisms of oxidative stress control by antioxidants produced from marine hydrobionts are also were discussed in the work.

Key words: oxidative stress, dyslipidemia, antioxidants.

Yan'kova V.I. – candidate of biology sciences, assistant professor, academic secretary,
e-mail: jankova_nch@list.ru

Knyshova V.V. – candidate of medical sciences, senior researcher of rehabilitation treatment laboratory

Lankin V.Z. – doctor of biology sciences, professor, the Head of Laboratory of free radical processes