

## **Исследование процесса окисления липосом с различным содержанием дигидрокверцетина**

Флавоноиды представляют собой большой класс бензо- $\gamma$ -пироновых производных, широко распространенных и содержащихся преимущественно во фруктах и овощах. Потребление этих натуральных продуктов считают очень важными для предотвращения широкого спектра заболеваний, включая аллергию, сердечно-сосудистые заболевания, определенные формы рака, болезней печени, и воспаление, связанные с воздействием свободных радикалов при патологических процессах [1-3].

Большинство фармакологических эффектов флавоноидов, по-видимому, связано с их антиоксидантными свойствами. Антиоксидантное действие флавоноидов рассматривают с точки зрения двух возможных механизмов действия: взаимодействие с радикалами и хелатирование металлов. Взаимодействие с радикалами происходит посредством отщепления водорода свободными радикалами (например, гидроксил-радикалом) от ядра флавоноида [4-7]. Многие флавоноиды с различными гидроксильными заместителями исследовались на их способность очищать среду от свободных радикалов, генерируемых в водной фазе, для объяснения взаимосвязи между их химической структурой и способностью отдавать водород [8-10].

Другой возможный антиоксидантный механизм связан с их хелатирующими металл свойствами с помощью фенольных ОН групп. Переходные металлы часто вовлекаются в генерацию свободных радикалов посредством разложения  $H_2O_2$  или гидропероксидов липида (LOOH), с образованием гидроксильного радикала или алкоксильного радикала, соответственно [11,12]. Флавоноид хелатируя металл может изолировать эти ионы и таким образом предотвратить формирование свободных радикалов.

С другой стороны группой ученых под руководством Наруми Сугихара (NARUMI SUGIHARA, et.al., 1999) было продемонстрировано наличие прооксидантного действия флавоноидов на модели гидропероксид липида (LOOH) – индуцированного окисления гепатоцитов. Этой группой ученых были проанализированы про/антиоксидантные свойства миррицетина, кверцетина, фисетина, кэмпферола, морина, лютеолина, апигенина и таксифолина (дигидрокверцетина). Необходимо отметить, что для таксифолина наблюдается наличие как анти- так и прооксидантной активности, в зависимости от концентраций  $Fe^{2+}$ , но с другим металлом показала только антиоксидантные свойства.

Исходя из того что флавоноиды являются гидрофобными соединениями (для дигидрокверцетина  $LogP = 1.82 \pm 0.41$ ), то для оценки их про/антиоксидантных свойств

необходимо учитывать реальную концентрацию присутствующую в липидной части препарата. Таким образом, актуальной задачей для изучения является оценка окисляемости липосомальных препаратов содержащих различные количества флавоноида. В качестве такого объекта исследования нами была выбрана модель окисления липосомального препарата “Фламена” полученного на основе яичного лецитина содержащего различное количество дигидрохверцетина. В процессе хранения липосом, и препаратов полученных на их основе, наблюдается окисление липидов с образованием малонового диальдегида и гидроперекисей липидов, а так же увеличивается содержание непредельных группировку в липидах. Подобные изменения напрямую отражаются на стабильности липосомальной мембраны и могут приводить к снижению времени сохранения целостности мембраны и разрушению липосомального препарата. Введение в препарат стабилизирующих добавок может, как ингибировать процесс окисления, так и ускорять его.

Изучение процесса окисления липосом с различным содержанием ДГК было разделено на 3 этапа: 1. исследование ТБК-активных продуктов в липосомальном препарате, 2. исследование накопления непредельных соединений в липидной части препарата и 3. изучение динамики рН внелипосомального окружения.

### ***Материалы и методы***

#### ***Пробоподготовка образцов***

Полученные образцы компании “Фламена” инкубировались при температуре 37°C по 3-схемам: 1. в атмосфере воздуха; 2. в присутствии 150 мкМ пероксида водорода; 3. с ежедневными добавками в образцы 150 мкМ пероксида водорода.

На 1, 2, 6, 10 и 16 сутки производился забор образцов в объеме 1 мл и до экспериментов хранились при -20°C.

В образцах определяли следующие параметры: содержание ТБК-активных продуктов, содержание непредельных соединений, изменение рН внелипосомальной среды.

#### ***Определение ТБК-активных продуктов***

К 50 мкл суспензии липосом добавляли 450 мкл раствора тиобарбитуровой кислоты (2,5 мг/мл) в 2% орто-фосфорной кислоте. Полученный раствор инкубировался при 100°C в течение 1 часа и затем после добавления 500 мкл 96% этилового спирта регистрировался спектр в диапазоне 450-650 нм (спектрофотометр UV-Vis “Specord-M40”, Carl Zeiss, Германия). Математическими методами определялась оптическая плотность при 460, 500 и 532 нм, которые характерны для максимумов поглощения соответствующих ТБК-КС (карбонильных соединений).

#### ***Определение содержания непредельных групп в липиде***

К 50 мкл суспензии липосом добавляли 5 мкл спиртового раствора (5%) иода. После 1 часа инкубации к образцам добавляли 945 мкл 96% этанола и регистрировали спектр в диапазоне 450-700 нм (спектрофотометр UV-Vis “Specord-M40”, Carl Zeiss, Германия). Наличие пиков адсорбции, характерных для образования аддуктов с ТБК, при 490 и 510 нм обусловлено образованием монокарбонильных соединений (альдегидов) реагирующих с ТБК, тогда как для продукта конденсации ТБК-МДА характерно поглощение при 532 нм [Knight J.A., et.al., 1988; Kosugi H., et.al., 1985].

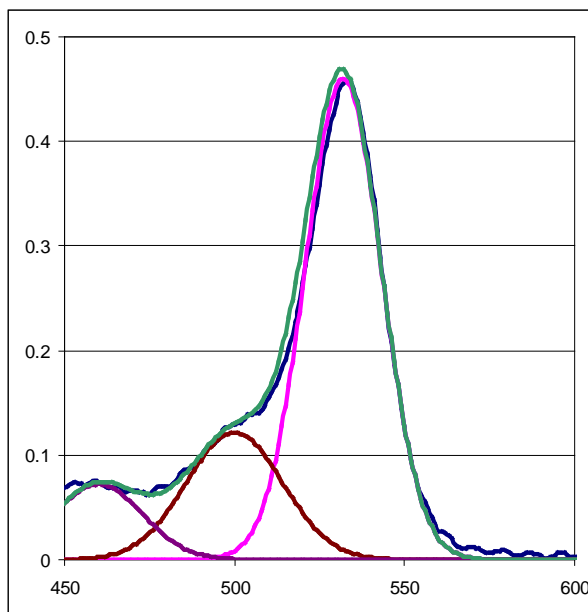


Рисунок 1. Характеристический спектр адсорбции ТБК-КС

### *Измерение pH в образцах*

Образцы липосом объемом 10 мл инкубировали при 37°C в атмосфере воздуха насыщенной водяными парами (для предотвращения испарения образца). Ежедневно измерялось значение pH для данных образцов и соответствующих (по концентрации) растворов дигидрохверцетина в воде (pH-метр/ионометр “Mettler Toledo”, Швейцария).

*Анализ данных* спектрофотометрии и pH-метрии проводился с помощью программ MS Excel и TableCurve 2D v. 5.0 (рис. 1).

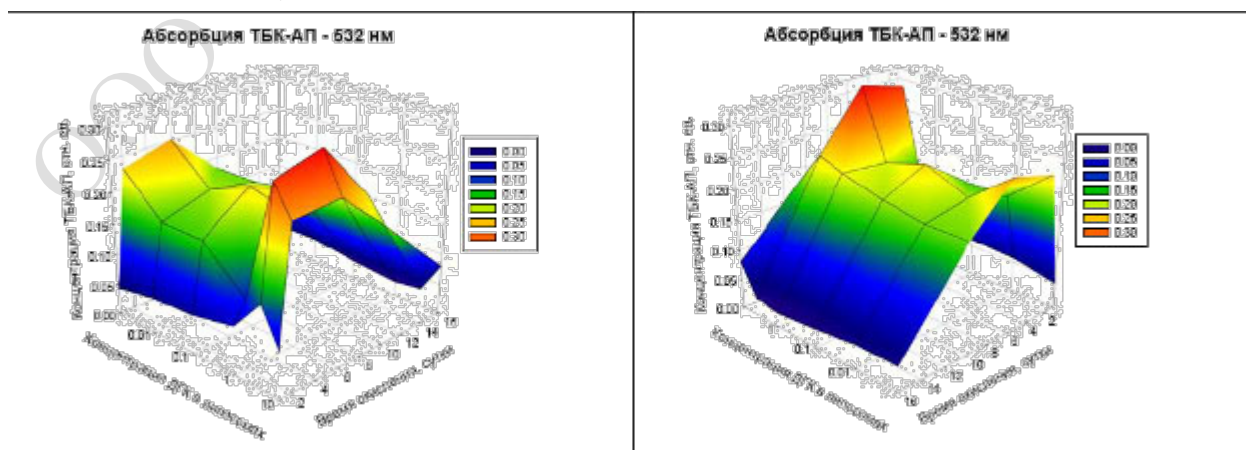
## 1. Исследование ТБК-активных продуктов в липосомальном препарате

Единственными продуктами, реагирующими с тиобарбитуровой кислотой, в препарате липосом, могут являться малоновый диальдегид и монокарбонильные альдегиды. Подобные продукты образуются при реакции ненасыщенных групп липидов с кислородом воздуха или пероксидом водорода. В связи с этим для изучения накопления ТБК-активных продуктов окисление липосом проводилось в атмосфере воздуха и в присутствии  $H_2O_2$ .

Измерение количества ТБК-КС (тиобарбитуровая кислота – карбонильное соединение) проводилось в относительных единицах, что связано с образованием окрашенных продуктов обладающих разными абсорбционными характеристиками  $\epsilon$  (но поглощающих в одном спектральном диапазоне (460, 500 и 532 нм)).

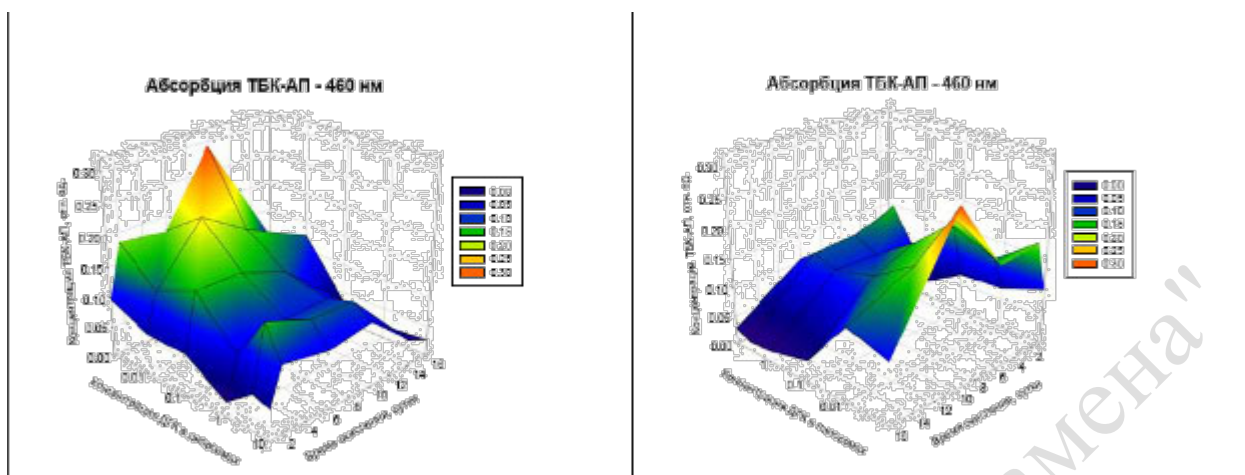
Первый этап работы включал анализ изменения ТБК-КС в липосомах с различным содержанием ДГК в условиях окисления под действием кислорода воздуха.

Наибольшим коэффициентом экстинкции при 532 нм в спектре ТБК-КС обладает продукт получающийся при конденсации ТБК с малоновым диальдегидом (МДА). Малоновый диальдегид является одним из главных продуктов окисления непредельных соединений, окисление в которых идет по аллильному механизму. Было обнаружено, что в диапазоне концентраций от 1 мкг/мл до 1 мг/мл концентрация МДА на 25-30% ниже, чем в контрольных образцах. Тем не менее, наличие высокого образования МДА (превышение на 20-25%, относительно контроля) в “стандартном” образце<sup>1</sup> (концентрация ДГК – 4 мг/мл), может быть связано с наличием прооксидантного эффекта (см. приложение 1) ДГК (Murzakhmetova M., et.al., 2008; Choi E.J., 2003). В липосомальном препарате в процессе их хранения изменение концентрации малнового диальдегида, продукт взаимодействия которого с ТБК поглощает при 532 нм, изменяется следующим образом:



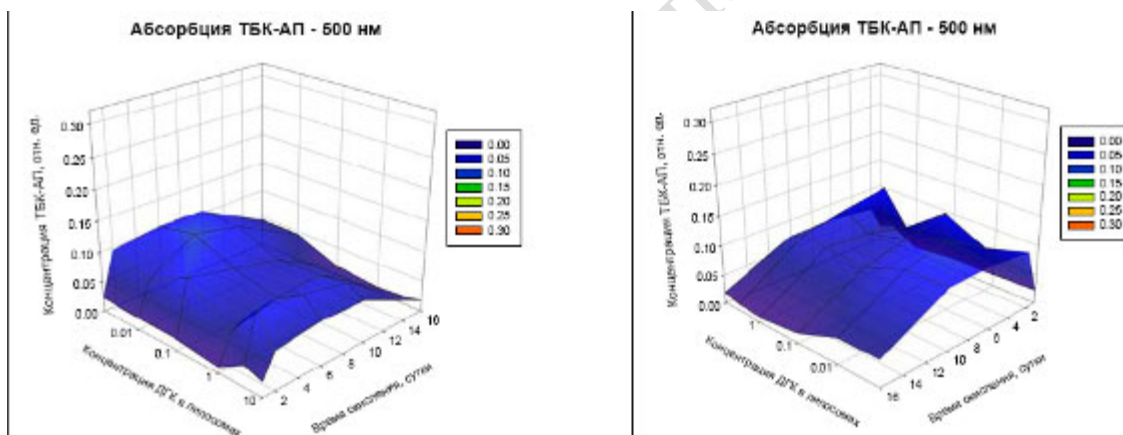
<sup>1</sup> Так же этот эффект может быть связан с тем, что “стандартный” образец был изготовлен раньше чем остальные образцы и в процессе хранения (по-видимому при температуре  $\sim 8^\circ C$  в течение 1-2 недель) успел накопить продукты окисления.

Наличие продуктов конденсации ТБК с высокомолекулярными альдегидами имеет преимущественно пики в области 450-460 нм. Таким образом, видно, что наличие ДГК в



липосомальном препарате дозозависимо ингибирует их образование во всем исследуемом диапазоне концентраций ДГК.

Помимо этого наличие пиков в этой области и существенно более низкая концентрация продуктов ТБК-КС поглощающих при 500 нм (преимущественно характерных для низкомолекулярных альдегидов, таких как ацетальдегид) говорит о структурной особенности конкретных липидов входящих в состав липосом.

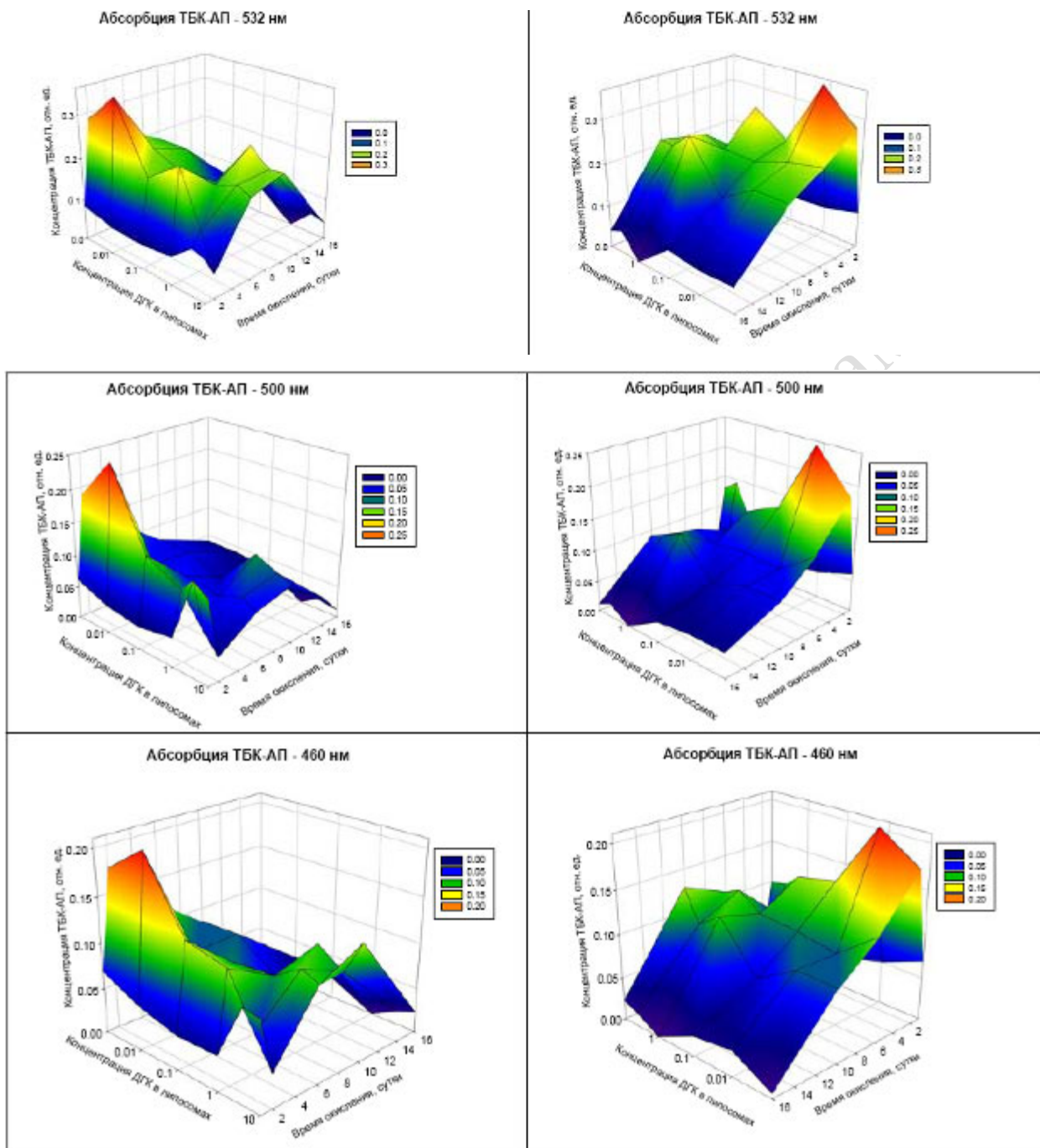


Еще одной особенностью является то, что максимальное накопление МДА приходится на 4-6 сутки, для монокарбонильных соединений пик приходится на 10-е сутки.

Использование в качестве окислителя экзогенного источника пероксидов – пероксида водорода, приводит к ускорению процесса накопления всех продуктов окисления, как МДА, так и монокарбонильных соединений, максимальное накопление которых в контроле приходится на 2 сутки.

Существенное ингибирование процесса окисления липидов в (4-5 раз) наблюдается только для монокарбонильных соединений, причем под действием пероксида водорода прооксидантный эффект обнаружен при концентрации ДГК в липосомах – 10 мкг/мл (25%

увеличение концентрации ТБК-КС). Для процесса накопления малонового диальдегида пик накопления зависит от концентрации ДГК, несколько смещая его во времени вплоть до 10 суток инкубации, против 2-х суток в контроле.

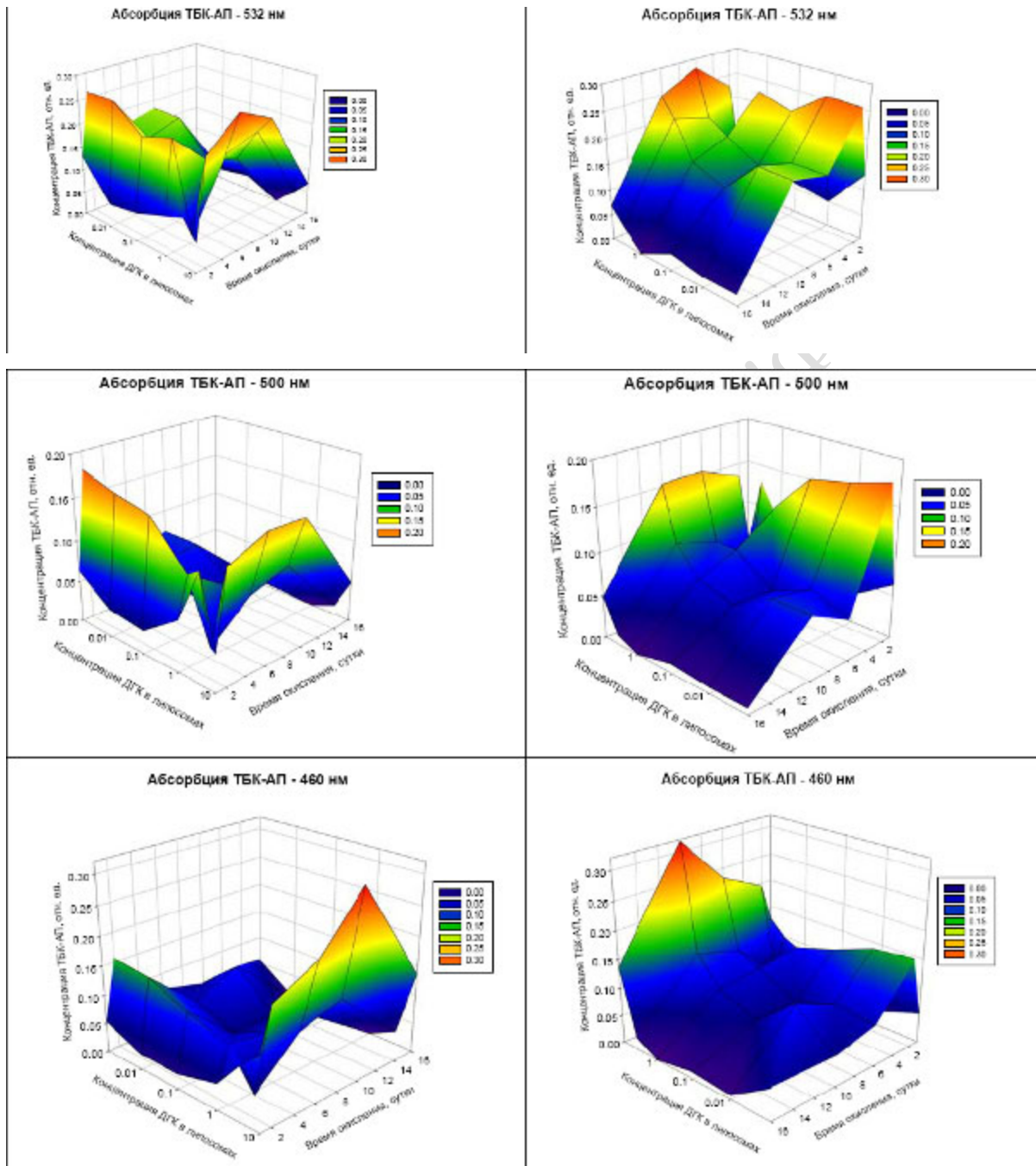


Наличие пика в области 500 нм, говорит о существенной деградации липидов и присутствие низкомолекулярных альдегидов в липидной части препаратов.

Ежедневная нагрузка липосом пероксидом водорода позволило бы выявить предел окисления липосомального препарата в условиях окислительного стресса.

Обнаружено, что до концентрации 0.1 мг/мл ДГК в липосомальном препарате наблюдается дозависимый эффект ингибирования процесса образования альдегидов, тогда как при концентрации 10 мг/мл этот эффект нивелируется и суммарное накопление

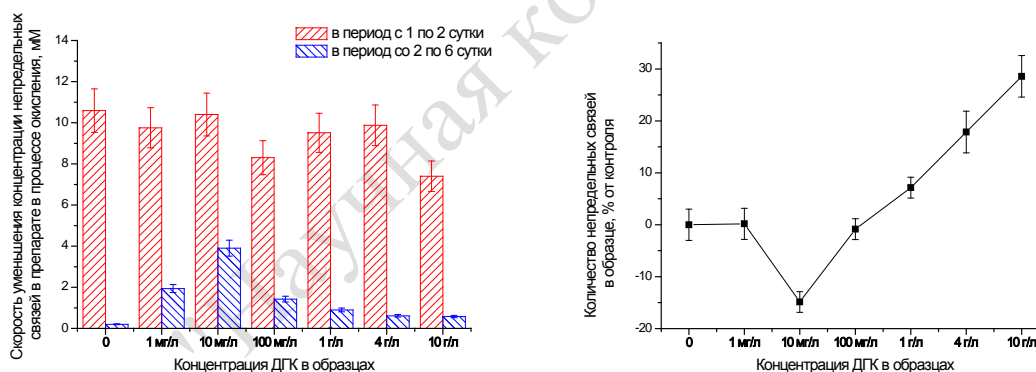
альдегидов выше чем в контроле. Образование же монокарбонильных соединений при концентрации ДГК – 10 мг/мл превышает контрольное значение более чем в 2 раз, что может объясняться либо наличием сильного прооксидантного действия ДГК, либо предотвращением дальнейшего окисления альдегидов до карбоновых кислот и т.о. должно проявляться в менее интенсивном снижении значений рН при этой концентрации ДГК.



## 2. Исследование накопления непредельных групп в липидной части препарата

Изменения содержания ненасыщенных групп в составе липидов определялось по изменению концентрации добавок иода вводимого к образцам через определенное время их инкубации при 37°C. Анализ процесса деградации/формирования ненасыщенных групп в составе липида определялось по скорости изменения количества данных непредельных связей. Обнаружено что в стандартных условиях (37°C, атмосфера воздуха) процесс деградации непредельных групп в период с 1 по 2 сутки не сильно изменятся в зависимости от концентрации ДГК в препарате (рис. 2.1a). При дальнейшей инкубации образцов существенные отличия в процессе окисления наблюдались для препаратов с концентрацией ДГК от 1 мг/л до 100 мг/л (рис. 2.1a). В данном диапазоне концентраций существенно увеличивалось скорость окисления непредельных групп, что так же хорошо видно из графика демонстрирующего разницу в количестве непредельных групп в липиде в зависимости от концентрации ДГК в препарате (рис. 2.1b).

Рис. 2.1 Изменение скорости деградации ненасыщенных групп липидов (a) и их количество в образце (b) в зависимости от содержания в препарате ДГК в условиях инкубации при 37°C и в атмосфере кислорода воздуха.

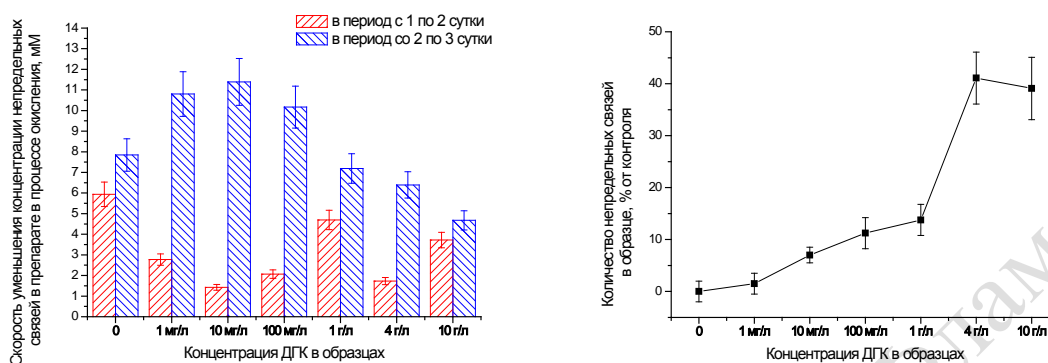


Введение в препарат фиксированного количества перекиси водорода приводит к смещению профиля окисления, и как видно из графика (рис. 2.2a) наблюдается увеличение скорости окисления непредельных групп как в контроле, так и в образцах с ДГК. Причем отмечается наличие существенного ингибирования от  $H_2O_2$ -индуцированного окисления липидов для образцов с низким содержанием ДГК (10 мг/л). Тем не менее, в последующем процесс окисления в данных образцах ускоряется, что, по-видимому, связано с увеличением радикальных форм и способностью ДГК катализировать ветвление свободно-радикальных реакций. Изменение количества



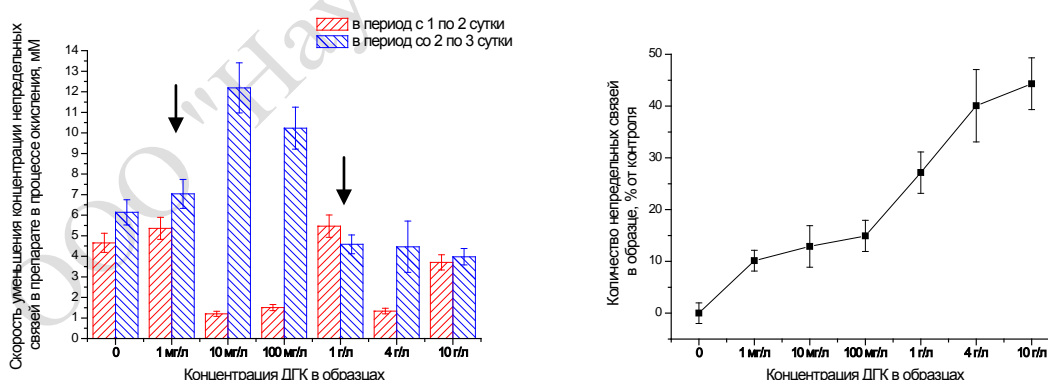
непредельных групп в образцах с различным содержанием ДГК может быть интерпретирован как четкий антиоксидантный эффект (рис. 2.2b).

Рис. 2.2 Изменение скорости деградации ненасыщенных групп липидов (а) и их количество в образце (b) в зависимости от содержания в препарате ДГК в условиях инкубации при 37°С и добавкой 150 мкМ пероксида водорода.



Однако, данные, полученные в схожем эксперименте, при котором добавка пероксида водорода к образцам проводилась ежесуточно (по 150 мкМ  $H_2O_2$ ) показал, что в ряде случаев (указано стрелками), наблюдалось снижение скорости деградации непредельных групп липидов (рис. 2.3a). С другой стороны, накопление непредельных групп в этом эксперименте превышает значение для соответствующих данных при однократном введении пероксида водорода в 2-5 раз (рис. 2.3b).

Рис. 2.3 Изменение скорости деградации ненасыщенных групп липидов (а) и их количество в образце (b) в зависимости от содержания в препарате ДГК в условиях инкубации при 37°С и добавкой 150 мкМ пероксида водорода.



Подобное поведение образцов может быть частично вызвано наличием прооксидантного эффекта ДГК<sup>2</sup> (в присутствии  $H_2O_2$ ), снижающегося при концентрации ДГК от 4 до 10 г/л.

<sup>2</sup> Альтернативное возможное объяснение связано с наличием у ДГК прооксидантного эффекта, описанное для многих флавоноидов. При этом дозависимо ускоряется процесс дальнейшего окисления непредельных соединений до соответствующих альдегидов и кислот, что, по-видимому вряд ли реализуется, исходя из данных по накоплению как альдегидов (см. раздел 1) так и кислот (см. раздел 3)

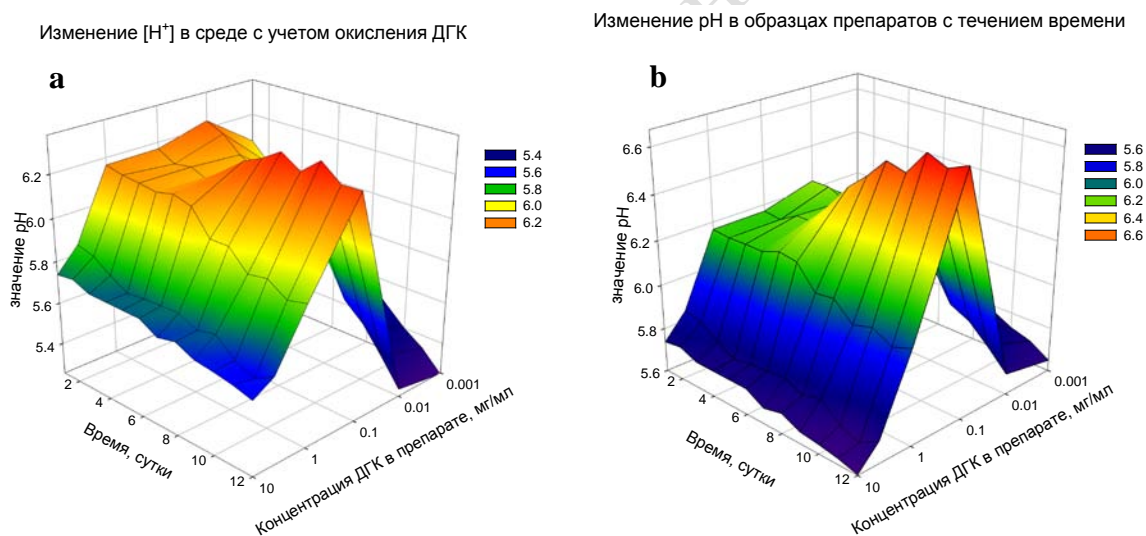
Образование большего числа непредельных связей может быть также спровоцированное самим ДГК, легко образующего радикальную форму при реакции с АФК и в дальнейшем способного реагировать с липидной частью молекулы либо отрывая водород в аллильном положении непредельных радикалов, либо ускоряя процесс дегидратации или окисления спиртовых групп (см. приложение 2).

ООО "Научная компания "Фламена"

### 3. Изучение динамики pH в нелипосомальном окружении

Обнаружено, что в процессе хранения липосомального препарата, pH среды, в контроле снижается, что объясняется тем, что в процессе окисления липидов наблюдается возрастание концентрации карбоновых кислот. Причем при концентрации ДГК –  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  мг/мл изменение pH достигает единицы, что говорит об интенсивном образовании карбоновых кислот, так же подтверждаемое данными по накоплению малонового диальдегида (см. раздел 1). Достоверное ингибирование процесса накопления карбоновых кислот наблюдается в диапазоне концентрации ДГК 0,03-0,79 мг/мл (рис. 3а). В пределах этой концентрации ДГК pH препарата составляет<sup>3</sup> -  $6,23 \pm 0,05$ . На графике видно, что, начиная с 5 суток, значение pH препарата возрастает (рис. 3б). Это говорит о том, что количество карбоксильных соединений снижается. Подобный эффект может быть обусловлен как образованием эфиров ДГК с карбоновыми кислотами<sup>4</sup>, так и наличием процесса окисления ДГК до соответствующего хинона<sup>5</sup> (см. приложение 3).

Рис.3 Изменение концентрации  $[H^+]$  в среде содержащей препарат “Фламена”.



*Вычисленные значения pH в среде с исследуемыми препаратами с учетом окислением ДГК в процессе инкубации.*

<sup>3</sup> Измерение проводилось в течение 12 суток и вычисление производилось с учетом окисления ДГК,  $p < 0,05$ . Без учета окисления ДГК pH для вышеописанного диапазона составляет  $6,42 \pm 0,11$ ,  $p < 0,05$ .

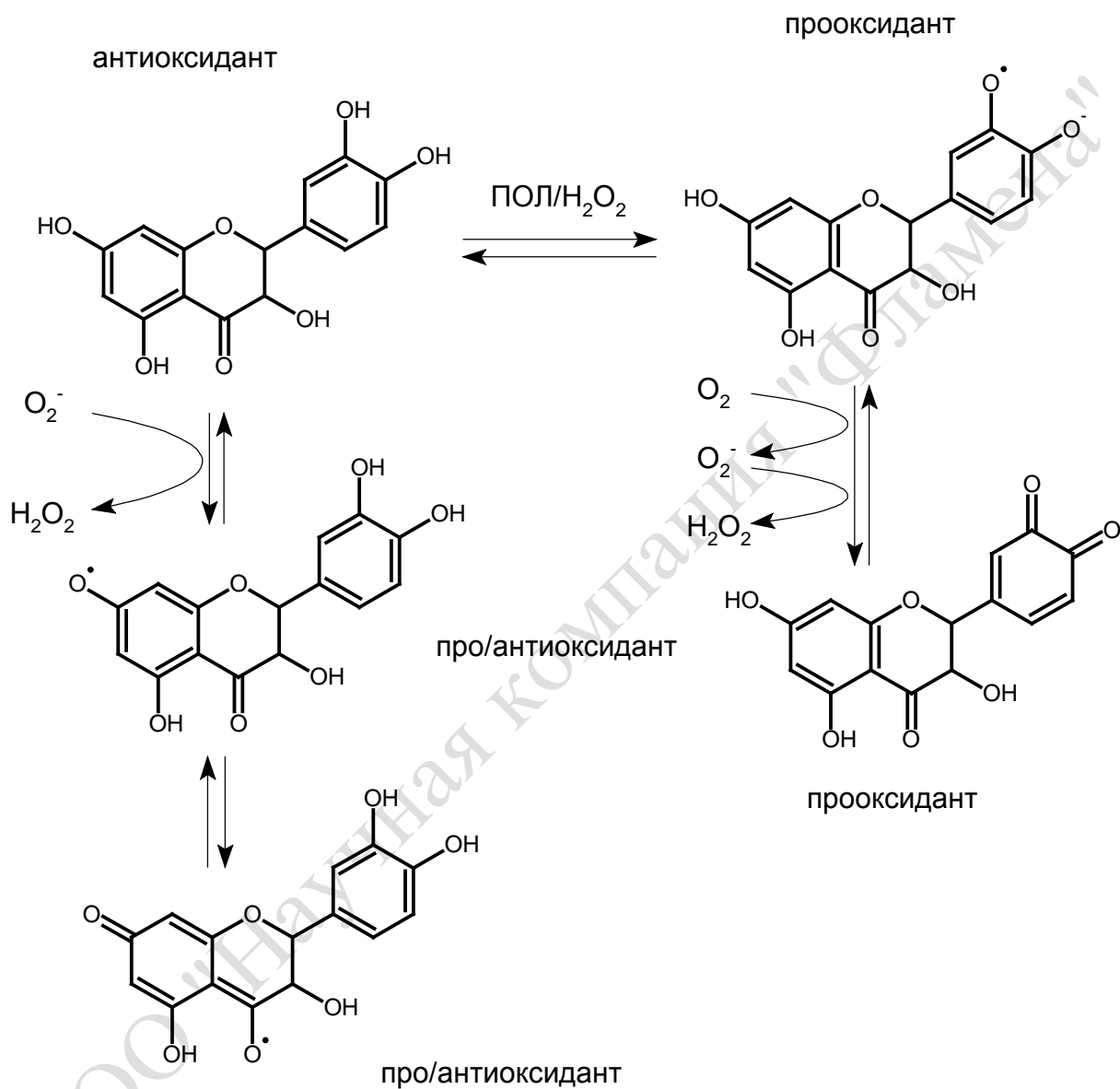
<sup>4</sup> Возможным объяснением этого могло бы быть наличие протонотворных свойств ДГК способного выравнять значение pH внутри и снаружи липосом. Но расчетные данные (исходя из концентрации частиц, их среднего размера и концентрации липида в препарате) показывают отсутствие полости внутри частиц. Другим подтверждением природы частиц является отсутствие сдвига pH при попытке образовать поры в “возможной мембране” частиц с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ-400), при этом сдвиг pH составил 0,03 единицы против теоретически возможного сдвига в 0,7-1,4 единицы (в зависимости от толщины мембраны)

<sup>5</sup> По-видимому, концентрация ДГК – 0,1 мг/мл является характерической в условиях окисления ( $t=37^\circ\text{C}$ ,  $\text{Co}_2=1,3 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} \approx 6,2$ )

Измеренные значения рН в среде с исследуемыми препаратами.

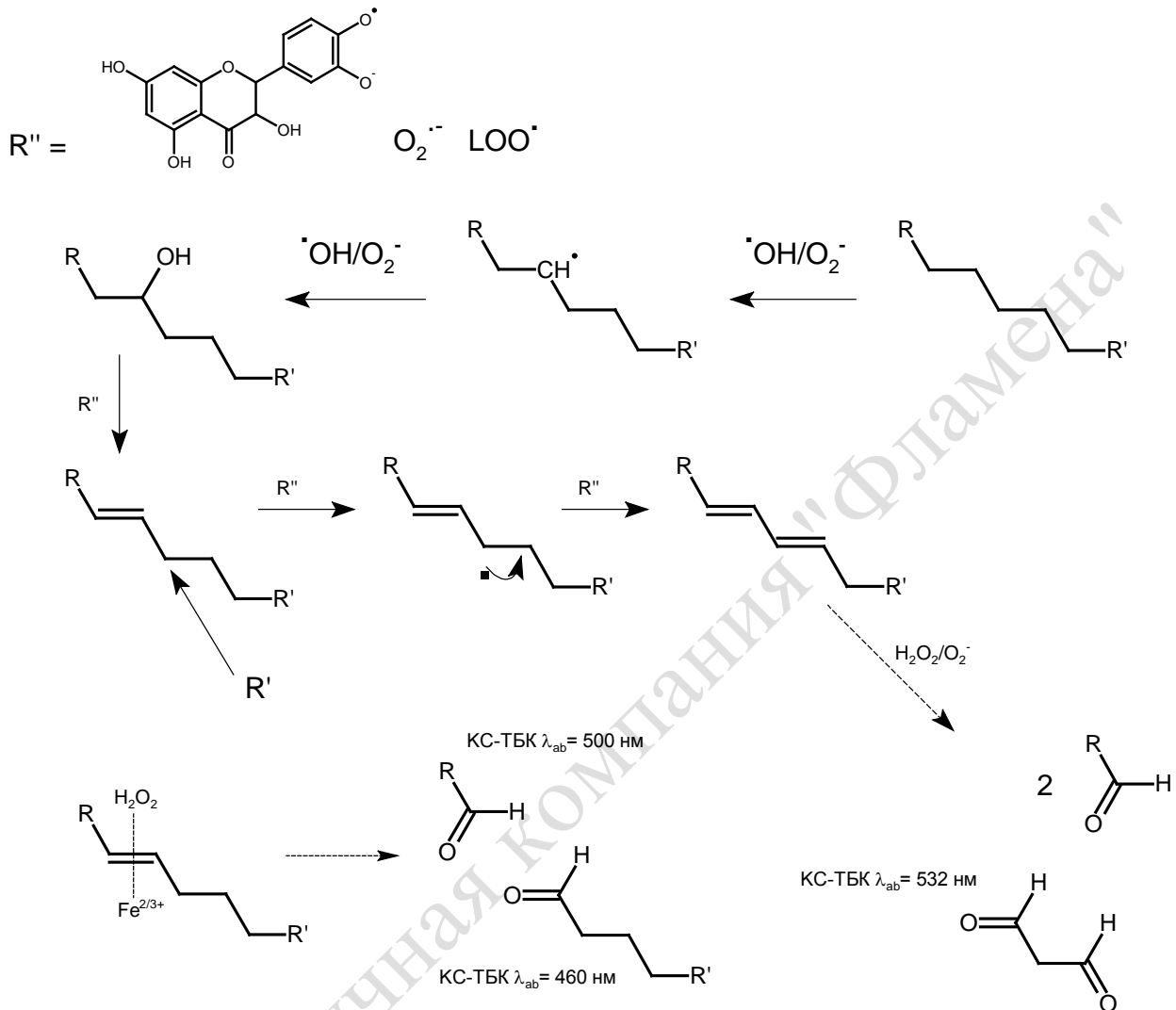
Приложение 1.

**Окислительно-восстановительные превращения дигидрокверцетина** [адаптировано из статьи Free Radic. Biol.Med., 1999(26), 107-116]



Приложение 2.

**Основные пути формирования непредельных групп в липиде и образование альдегидов в процессе окисления**



Приложение 3.

Схема основных превращений ДГК влияющих на pH раствора

