

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАНОСТАБИЛИЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ЭКСТРАКТА БАДАНА ТОЛСТОЛИСТНОГО И ЕГО ВЛИЯНИЯ НА МОНООКСИГЕНАЗНУЮ СИСТЕМУ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

Большунова Е. А., Ламажапова Г. П., Жамсаранова С. Д.

ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления», Россия, Бурятия (670013, Улан-Удэ, ул. Ключевская, 40в), E-mail: elena85-08@mail.ru

В липосомальные структуры, содержащие природные полиненасыщенные жирные кислоты, был включен экстракт из черных листьев бадана толстолистного. В экспериментах *in vitro* исследована мембраностабилизирующая активность липосомальной формы фитоэкстракта. Как показали данные исследования, липосомальная форма растительного экстракта оказывала выраженное протекторное действие на мембраны эритроцитов при их повреждении на модели перекисного гемолиза. Оценивалось состояние монооксигеназной системы печени крыс, адаптирующихся к холоду. В ходе экспериментов установлено, что длительный холодовой стресс у крыс сопровождался увеличением продолжительности мединалового сна, тогда как липосомальная форма фитоэкстракта способна активировать монооксигеназную систему, что проявлялось в уменьшении продолжительности мединалового сна подопытных животных по сравнению с контролем.

Ключевые слова: бадан толстолистный, липосомы, липосомальная форма фитоэкстракта, холодовой стресс, монооксигеназная система, цитохром P-450, медунал.

RESEARCH OF MEMBRANESTABILIZING ACTIVITY OF LIPOSOMAL FORM OF *Bergenia crassifolia* EXTRACT AND IT INFLUENCE ON MONOOXYGENASE SYSTEM OF LIVER MICROSOMES OF ANIMALS UNDER COLD STRESS

Bolshunova E. A., Lamazhapova G. P., Zhamsaranova S. D.

¹FSBAA HPA "East Siberia State University of Technology and Management", 670013, 40v Klyuchevskaya str., Ulan-Ude, Buryatia, Russia, E-mail: elena85-08@mail.ru

Extract from *Bergenia crassifolia*' black leaf was included into liposomal structures containing natural polyunsaturated fatty acids. In *in vitro* experiment membranestabilizing activity of liposomal form of phytoextract was investigated. As shown by this study, liposomal form of plant extract has a marked protective effect on the erythrocytes membranes during disruption in a model of peroxide hemolysis. The state of the livermonoxygenase system of rats adapted to cold was assessed. The experiment revealed that long-term cold stress in rats was accompanied by increasing of medinal sleep duration, while the liposomal form of phytoextract able to activate monoxygenase system, which was manifested in a decrease in medinal sleep duration of experimental animals compared with controls.

Kew words: *Bergenia crassifolia*, liposomes, liposomal form of phytoextract, cold stress, monoxygenase system, cytochrome P-450, medinal.

Введение

Уровень здоровья людей не только в России, но и в мире вызывает беспокойство в последнее время. Абсолютно здоровыми считаются 5–7 % от общей численности населения, 70–75 % имеют одно-два хронических заболевания в стадии устойчивой ремиссии. Такая отрицательная статистика является следствием развития человечества, которое не успевает приспосабливаться к нарастающему информационному потоку, регулярным стрессорным раздражителям и неблагоприятным экологическим влияниям. Защитная (адаптационная) система человека подвергается постоянным перегрузкам, при этом скорость восстановления функциональных резервов (адаптационного потенциала) организма недостаточна для их

восполнения. Формируется и прогрессирует неспособность адаптационной системы к адекватным защитным реакциям организма в ответ на повреждающие влияния внешней среды. Нарушается нормальная адаптация организма человека, что является начальной стадией развития хронических болезней [1]. Особенно большое значение это имеет в условиях северных широт и в зимний период. При этом изучение биохимических механизмов нарушений при холодовом стрессе важно для поиска путей восстановления и повышения адаптационных возможностей различных ферментативных систем организма. В этом аспекте особого внимания заслуживает монооксигеназная цитохром P-450-содержащая система печени, выполняющая функцию детоксикации в организме. Цитохром P-450 может рассматриваться как специфический внутриклеточный рецептор, запускающий через образуемые при его же участии эндогенные биологически активные вещества (стероидные гормоны, метаболиты витаминов А и D, окись азота и др.) важнейшие системные процессы, в том числе процессы адаптации [9]. Расширение возможных путей использования природных адаптогенов и повышение их фармакологической эффективности является весьма актуальным на сегодняшний день.

Среди перспективных компонентов для получения средств повышенной биологической ценности важная роль может быть отведена бадану толстолистному. В состав черных листьев бадана входят вещества, обладающие адаптогенными, антистрессорными, антиоксидантными и иммуномодулирующими свойствами [4, 10].

Известно, что липосомы являются нетоксичными, высокоэффективными переносчиками лекарственных веществ [6]. Жир байкальской нерпы богат полиненасыщенными жирными кислотами (ПНЖК) и может быть использован при получении липосомальных структур.

Целью работы явилось определение мембранстабилизирующей активности липосомальной формы экстракта из черных листьев бадана толстолистного и состояния монооксигеназной системы печени экспериментальных животных в условиях адаптации организма к холоду при применении данного средства.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования проводились на белых беспородных крысах обоего пола массой 150–200 г из питомника филиала №5 ГНЦ «Институт биофизики» федерального управления «Медбиоэкстрем» при Минздраве России, г. Ангарск. Животные находились в стандартных условиях содержания в виварии на обычном рационе [8]. Эксперименты осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [7].

Экстракт сухой из черных листьев бадана, собранных в Прибайкальском районе Республики Бурятия в весенний период 2009–2010 гг., был получен по методике Лубсандоржиевой П-Н.Б. [4].

В работе были использованы липосомы на основе фосфолипидов печени нерпы, содержащие в своем составе триацилглицеролы жира байкальской нерпы в концентрации 200 мкг/мл (в пересчете на жир нерпы); липосомы, нагруженные сухим экстрактом из черных листьев бадана толстолистного; водный раствор сухого экстракта из черных листьев бадана толстолистного.

Изучение адаптационных реакций животных проводили при помощи модели длительного холодового воздействия. Ежедневно в утренние часы животных на 3 часа помещали в климатокамеру при температуре минус $15\pm 2^{\circ}\text{C}$ при 50 % влажности в течение 21 дня. В работе камеры создавался постоянный режим охлаждения и предусматривалась подача воздуха для предупреждения кислородной гипоксии.

Одновременно исследовали 5 групп животных: 1 – интактная – находилась в стандартных условиях вивария; остальные группы подвергали охлаждению по приведённой выше схеме: 2 – контрольная; 3 – подопытная – ежедневно перед помещением в климатокамеру крысам перорально вводили экстракт бадана толстолистного (ЭБТ) в объеме 0,5мл; 4 – подопытная – перорально вводили липосомы (ЛС) в объеме 0,5мл; 5 – подопытная – перорально вводили липосомальную форму экстракта черных листьев бадана толстолистного (ЛС+ЭБТ) в объеме 0,5 мл.

Мембраностабилизирующую активность средства определяли с использованием методов *in vitro* по выраженности перекисного гемолиза эритроцитов, вызываемого реактивом Фентона [3].

С целью оценки монооксигеназной системы печени проводили исследования по продолжительности мидналового сна при однократном интраперитонеальном введении крысам миднала в дозе 60 мг/кг [5].

Полученные цифровые данные обрабатывали статистически с использованием непараметрических (Вилкоксона – Манна – Уитни) [2] и параметрических (Стьюдента – с помощью компьютерной программы Jandel SigmaPlot32) критериев. Различия считали достоверными при вероятности 95 % ($p\leq 0,05$).

Результаты исследований и их обсуждение

Исследования по определению влияния липосомальной формы ЭБТ, хранившейся при $t=+4^{\circ}\text{C}$, на перекисный гемолиз эритроцитов проводили с периодичностью в один месяц по приведенным выше методикам. Данные эксперимента представлены в таблице 1.

Таблица 1. Мембраностабилизирующая активность липосомальной формы ЭБТ

Сроки хранения, мес	Перекисный гемолиз, ед. опт. пл.						
	0	1	2	3	4	5	6
контроль	0,391± 0,024						
Липосомальная форма экстракта из черных листьев бадана толстолистного	0,137± 0,012*	0,154± 0,011*	0,224± 0,015*	0,243± 0,014*	0,334± 0,021*	0,378± 0,018	0,472± 0,026

Примечание: * - достоверное отклонение значения от контроля.

В результате проведенных исследований установлено, что липосомальная форма ЭБТ оказывала выраженное ингибирующее влияние на гемолиз эритроцитов, вызванный реактивом Фентона, причем мембраностабилизирующее действие сохранялось на высоком уровне до 5 месяцев хранения (табл. 1). Об этом свидетельствовало уменьшение степени перекисного гемолиза эритроцитов на 60,62; 42,72; 37,86; 14,58 и 3,33 % при сроках хранения 1, 2, 3, 4, 5 месяцев, соответственно, по сравнению с контролем. Как видно из представленных данных, к концу 5-го месяца хранения липосомы теряли свою мембраностабилизирующую активность, приближаясь к значениям контроля.

Учитывая, что свободные радикалы, образующиеся в реакции Фентона, индуцируют перекисное окисление липидов клеточных мембран и как следствие этого приводят к гемолизу эритроцитов, можно полагать, что в основе механизма мембраностабилизирующего действия ЛС+ЭБТ лежит ингибирование процессов свободнорадикального окисления биологических мембран в аналогичные сроки хранения.

При изучении влияния мединалового сна всем животным вводили раствор диэтилбарбитурата натрия (мединала) из расчета 300 мкл на 20 г массы тела. Испытуемые средства вводили за час до эксперимента по обычной схеме, приведенной выше. Фиксировали продолжительность сна. Результаты полученных данных отражены на рисунке 1.

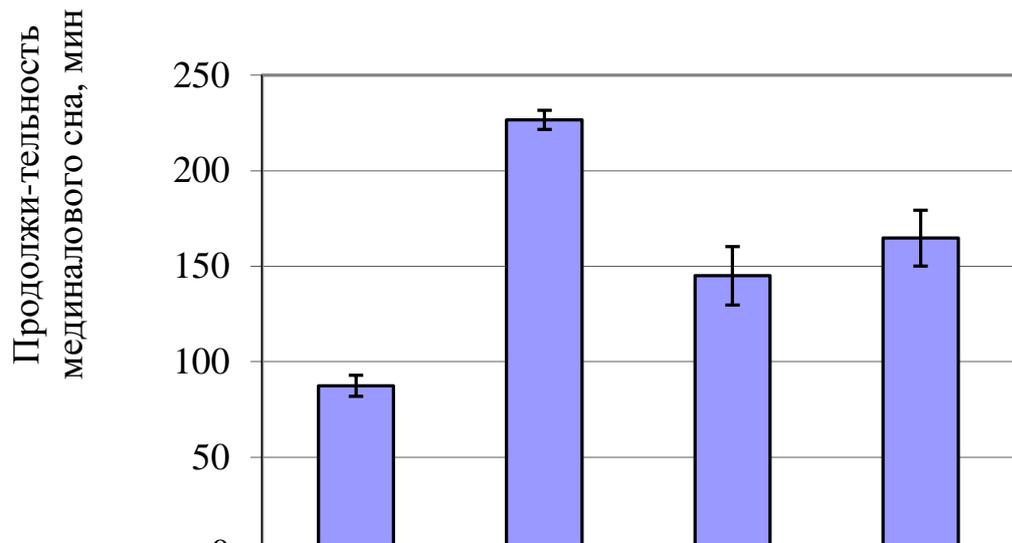


Рис. 1. Показатели продолжительности медунального сна крыс в условиях холодового стресса и введения изучаемых средств

При холодовом стрессе было отмечено увеличение продолжительности медунального сна в 2,6 раза по сравнению с интактом. При введении ЭБТ данный показатель уменьшался в 1,6 раз по сравнению с контролем. При введении ЛС также наблюдалось уменьшение продолжительности медунального сна в 1,4 раза по сравнению с контролем. Аналогичная ситуация обстоит и в случае введения животным ЛС+ЭБТ: было отмечено уменьшение данного показателя в 2 раза по сравнению с контролем, в 1,3 раза по сравнению с ЭБТ и в 1,4 раза по сравнению с ЛС.

Мединал, являясь лекарственным препаратом, с одной стороны, стимулирует активность монооксигеназ, с другой – обеспечивает достаточно быстрый возврат их индуцированной активности к исходному уровню. Все это может говорить о том, что мединал, увеличивая эффект индукции ферментов при холодовом стрессе, может влиять на фармакокинетику исследуемых средств. Из результатов эксперимента видно, что липосомальная форма экстракта из черных листьев бадана толстолистного оказывает возбуждающее действие на центральную нервную систему, и, тем самым, на выработку ферментов печени, в частности, укорачивает медунальный экспериментальный сон. Вероятно, это связано с действием находящихся в составе черных листьев бадана толстолистного флавоноидов и арбутина. Проведенные исследования позволяют нам также сделать вывод о том, что эффект корректирующего действия при введении ЛС+ЭБТ более выражен, чем при введении ЭБТ и ЛС.

Заключение

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что липосомальная форма экстракта из черных листьев бадана толстолистного обладает выраженной мембраностабилизирующей активностью, проявляет антиоксидантные свойства в условиях холодового стресса. Результаты данных исследований по оценке монооксигеназной системы подтверждают положение о том, что эффективность стимуляторов адаптационного ответа связана не только с их способностью индуцировать резистентность организма, но и с оксидантными свойствами. Воздействие холода изменяет спектр цитохрома Р-450 и связанную с ним монооксигеназную активность в сторону увеличения продолжительности медунального сна. ЛС+ЭБТ, благодаря наличию в своем составе фенольных соединений и ПНЖК, наоборот, активирует монооксигеназную систему, что проявляется в уменьшении продолжительности сна крыс.

Липосомальная форма экстракта черных листьев бадана толстолистного может быть рекомендована в качестве профилактического средства, снижающего выраженность стресс-синдрома, для повышения устойчивости организма к воздействию экстремальных факторов, и, в частности, холода.

Список литературы

1. Бабий Н. В. Разработка и оценка потребительских свойств фитонапитков на основе природных адаптогенов: Дисс. ... канд. тех. н. – Кемерово, 2009. – 148 с.
2. Гублер И. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Л., 1973. – 53 с.
3. Ковалев И. Е., Данилова Н. П., Андронати С. А., Жеребин Ю. Л. Влияние эномеланина на гемолиз эритроцитов, вызываемый свободнорадикальными реакциями и другими факторами // Фармакология и токсикология. – 1986. – № 4. – С. 89–91.
4. Лубсандоржиева П.-Н.Б. Серия: Лекарственные растения тибетской медицины. Бадан толстолистный. – Улан-Удэ: Изд-во БНЦ СО РАН, 2002. – 90 с.
5. Мамыкова О. И. Иммунорегуляторная активность стимулятора неспецифической резистентности риботана и его ингибирующее действие на систему цитохрома Р-450 печени мышей, инвазированных *A. Tetraptera* // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2009. – №5. – С. 51–54.
6. Назаров Г. В., Галан С. Е., Назарова Е. В. и др. Наноразмерные формы лекарственных соединений // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – Т. 43. – №3. – С. 41–48.
7. «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» // Приложение к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.77.
8. Приказ МЗ СССР №1179 от 10.10.83 г.

9. Прокопьева Н. В., Гуляева Л. Ф., Полякова Н. Е. Изменение микросомальной монооксигеназной системы печени крыс при индукции фенobarбиталом на фоне острого панкреатита // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т. 45. – №4. – С. 321–325.
10. Седунова Е. Г. Влияние экстракта бадана толстолистного на состояние иммунной системы организма в эксперименте: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Улан-Удэ, 2000. – 26 с.

Рецензенты:

Шантанова Лариса Николаевна, д.б.н., профессор, профессор кафедры анатомии и физиологии Бурятского государственного университета, г. Улан-Удэ.

Мондодоев Александр Гаврилович, д.м.н., вед. науч. сотр. лаборатории экспериментальной фармакологии Института общей и экспериментальной биологии СО РАН, г. Улан-Удэ.