ВЛИЯНИЕ ФИТИНОВОЙ КИСЛОТЫ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫХ НА ПАРАМЕТРЫ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ КРОВИ *in vitro*

А. К. Мартусевич[1], М. В. Сидорова[2], Н. Б. Мельникова[2], А. Г. Соловьева[1], С. П. Перетягин[1]

Изучена модификация процессов перекисного окисления липидов в цельной консервированной крови при действии растворов ксимедона (19,6 мкМ), фитиновой кислоты (117,9 мкМ) и её комплексов (237,6 мкМ), синтезированных на дистиллированной воде и 0,9 % растворе хлорида натрия. В плазме крови и эритроцитах определяли интенсивность липопероксидации и общую антиоксидантную активность, активность супероксиддисмутазы, уровень малонового диальдегида. Установлено, что введение в образцы крови раствора фитиновой кислоты приводит к умеренной стимуляции общей антиоксидантной активности биосреды и активности супероксидисмутазы на фоне превалирования прооксидантного эффекта. Комплекс "фитиновая кислота — ксимедон", синтезированный на дистиллированной воде, оказывает выраженное антиоксидантное действие, а при его приготовлении на физиологическом растворе проявляет прооксидантные свойства.

Ключевые слова: фитиновая кислота; ксимедон; перекисное окисление липидов; малоновый диальдегид; супероксиддисмутаза.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что энергодефицит и дисбаланс про- и антиоксидантных систем являются универсальными патологическими процессами [3].

Поиск и изучение фармакологической активности синтетических соединений, обладающих антиоксидантным и энергокорректирующим эффектами, является актуальным. На этом основании наше внимание привлекли ксимедон, широко используемый как препарат метаболического действия, проявляющий умеренную антиоксидантную активность [1, 2, 4, 12], и фитиновая кислота (инозитолгексафосфат, IP_6; рис. 1), эффективность которой как противоопухолевого средства и модулятора восстановительных процессов костной ткани обсуждается в последние годы преимущественно в зарубежной литературе [15, 17 – 19]. Кроме того, для фитиновой кислоты описаны эффекты, позиционирующие ее в качестве антиоксиданта [15, 18, 19].

Фитиновая кислота обладает высокой анионной активностью и способна образовывать комплексные соединения с положительно заряженными органическими лигандами (ксимедон) и катионами металлов (Na^+). Из литературных данных известно, что ионы натрия образуют прочные комплексы как с фитиновой кислотой, так и с фитатами металлов [20]. По-видимому, в комплексе, приготовленном на физиологическом растворе, имеет место конкурентное связывание ионов Na^+ с фитиновой кислотой, с частичной заменой ксимедона, либо с присоединением к одной из свободных гидроксильных групп фитиновой кислоты.

С учётом этого данная работа посвящена уточнению характера влияния комплекса "фитиновая кислота — ксимедон" на состояние процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в биологической жидкости *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучен характер реакции цельной консервированной крови при действии ксимедона, фитиновой кислоты и их комплексов (комплексы ксимедона фитата получены на кафедре фармацевтической химии и фармакогнозии ГБОУ ВПО НижГМА Минздрава России). Использовали кровь, полученную от 10 доноров (по 25 мл). Для проведения эксперимента ее разделяли на 5 порций (интактную и 4 опытных).

В первую опытную порцию крови (5 мл) добавляли 0,5 мл водного раствора ксимедона (19,6 мкМ), во вторую — водный раствор фитиновой кислоты (117,9 мкМ), в третью — водный раствор комплекса "фитиновая кислота — ксимедон" (237,6 мкМ), в четвёртую — изотонический раствор комплекса "фитиновая кислота — ксимедон" (приготовлен на физиологическом растворе) (237,6 мкМ). Выбор концентраций фитиновой кислоты, ксимедона и комплекса ксимедона фитата выполнен по известной методике [16], в соответствии с которой изучается взаимодействие железо-катехольного комплекса с хелаторами (лигандами, способными вытеснить железо из катехольного комплекса; рис. 2). Экспозиция после введения препаратов в инкубационную среду составляла 5 мин. Сразу после этого кровь центрифугировали при 1500 об$^{-1}$ в течение 15 мин. Непосредственно по завершении фракционирования в плазме крови и эритроцитах каждой порции определяли максимальную фотовспышку, светосумму хемилюминесценции (показатель интенсивности процессов липопероксидации плазмы и пе-

[1] ФГБУ "ННИИТО" Минздрава России, 603155, Нижний Новгород, Верхне-Волжская наб., 18/1.
[2] ГБОУ ВПО "НижГМА" Минздрава России, 603950, Нижний Новгород, ул. Минина, 10/1.

© 2014 Коллектив авторов

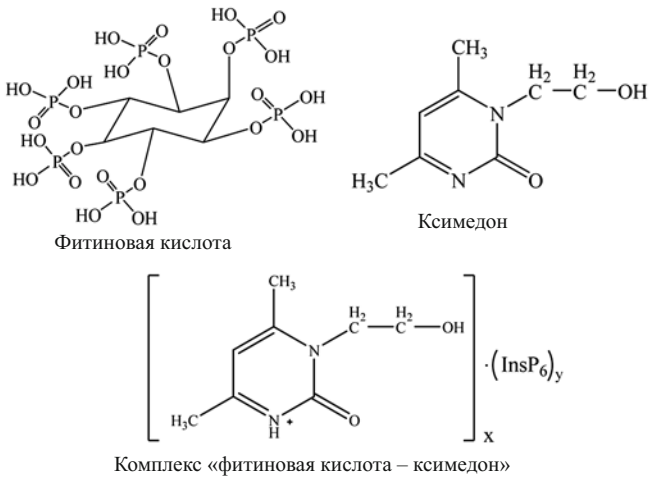

Рис. 1. Химическая структура фитиновой кислоты, ксимедона и их комплекса.

рекисной резистентности эритроцитов) и тангенс угла максимального наклона кривой к оси времени (показатель уровня антиоксидантной активности биосубстрата) методом Fe-индуцированной биохемилюминесценции на аппарате БХЛ-06 [6].

Активность супероксиддисмутазы (СОД) оценивали по [14]. Уровень малонового диальдегида (МДА) в плазме и эритроцитах определяли с помощью тест-набора (ЗАО “АГАТ”, Москва).

Результаты обрабатывали с использованием программы Statistica 6.0. Нормальность распределения значений параметров оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. С учетом характера распределения признака для оценки статистической значимости различий применяли Н-критерий Краскала-Уоллеса.

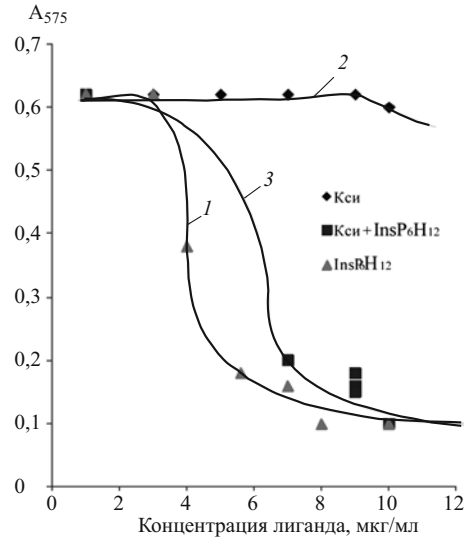

Рис. 2. Взаимодействие железо-катехольного комплекса с лигандами: *1* — фитиновая кислота; *2* — ксимедон; *3* — комплекс ксимедона фитата.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ светосуммы хемилюминисценции плазмы крови контрольного и опытных образцов (рис. 3) позволил установить, что фитиновая кислота обуславливает нарастание данного параметра на 37 % ($p < 0,05$) по отношению к контролю, тогда как ксимедон не вызывает значительного изменения светосуммы хемилюминесценции образцов крови.

В свою очередь, комплекс “фитиновая кислота — ксимедон”, приготовленный на физиологическом растворе, демонстрирует активацию ПОЛ плазмы по сравнению с интактным образцом крови ($p < 0,05$), и отсутствие отличия от образца, в который вводили фитиновую кислоту в индивидуальном виде ($p > 0,05$). В

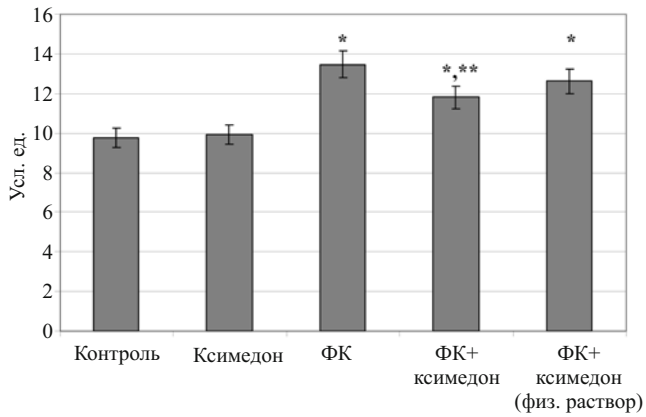

Рис. 3. Влияние фитиновой кислоты (ФК) и ее производных на светосумму хемилюминесценции плазмы донорской крови:

* — уровень статистической значимости различий $p < 0,05$ по отношению к контрольному образцу;
** — уровень статистической значимости различий $p < 0,05$ по отношению к образцу, в который вводили фитиновую кислоту.

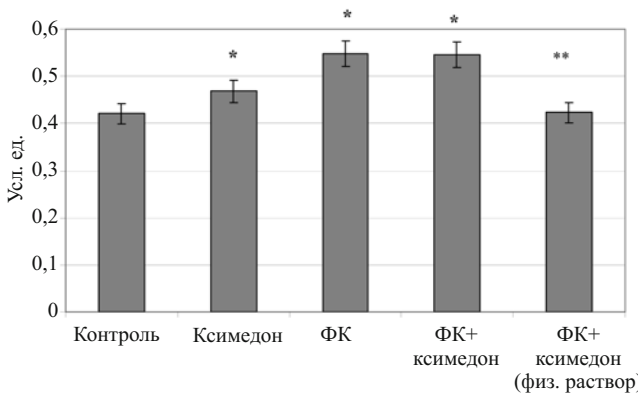

Рис. 4. Влияние фитиновой кислоты (ФК) и ее производных на общую антиоксидантную активность плазмы крови:

* — уровень статистической значимости различий $p < 0,05$ по отношению к контрольному образцу;
** — уровень статистической значимости различий $p < 0,05$ по отношению к образцу, в который вводили фитиновую кислоту.

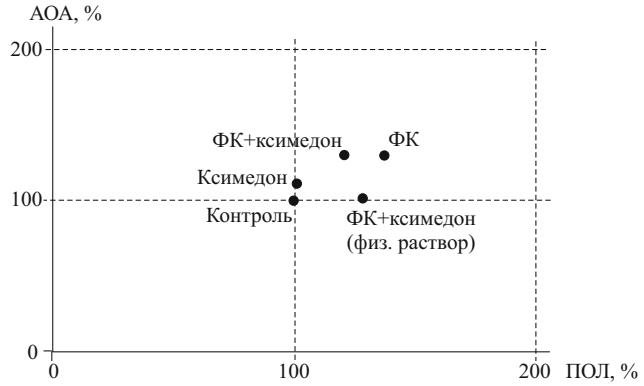

Рис. 5. Влияние изучаемых фармацевтических субстанций на баланс про- и антиоксидантных систем крови:

ФК — фитиновая кислота, физ. раствор — 0,9 % раствор хлорида натрия; АОА — общая антиоксидантная активность (тангенс 2$\acute{\alpha}$).

то же время водный раствор комплекса проявляет стимулирующее действие на процессы липопероксидации в плазме крови ($p < 0{,}05$), однако уровень светосуммы хемилюминесценции в этом случае не достигает значений, характерных для образцов, содержащих только фитиновую кислоту ($p < 0{,}05$). Выявлено, что при действии комплекса, приготовленного на физиологическом растворе, светосумма хемилюминесценции увеличивается на 29 %, тогда как при синтезе комплекса в дистиллированной воде — только на 20 %. На основании этого можно предположить, что для последнего характерен наиболее оптимальный ответ биосистемы по рассматриваемому параметру.

Особый практический интерес представляет изучение влияния тестируемых соединений на антиоксидантную активность крови (рис. 4). Выявлено, что ксимедон демонстрирует умеренное нарастание данного показателя, что подтверждают сведения из литературы [1, 2, 4, 7]. Согласно полученным результатам, максимальная общая антиоксидантная активность регистрируется при введении в образцы крови водных растворов фитиновой кислоты и её комплекса с ксимедоном, возрастая в 1,3 раза по сравнению с контролем ($p < 0{,}05$ для обоих случаев). Напротив, при добавлении комплекса “фитиновая кислота — ксимедон”, синтезированном на изотоническом растворе хлорида натрия, рассматриваемый параметр сохраняется на уровне контрольных значений, что в сочетании с наблюдаемой при этом стимуляцией ПОЛ негативно характеризует действие рассматриваемого комплекса в целом. Кроме того, подобная динамика показателя может косвенно свидетельствовать об иной химической структуре при образовании комплекса в физиологическом растворе по сравнению с дистиллированной водой [10].

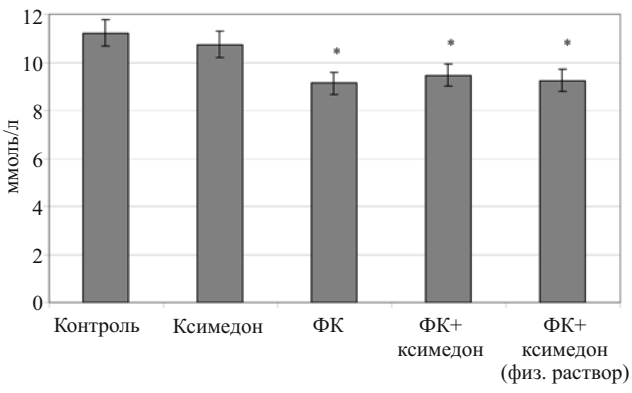

Рис. 7. Концентрация малонового диальдегида в эритроцитах при действии фитиновой кислоты (ФК) и ее производных:

* — уровень статистической значимости различий $p < 0{,}05$ по отношению к контрольному образцу.

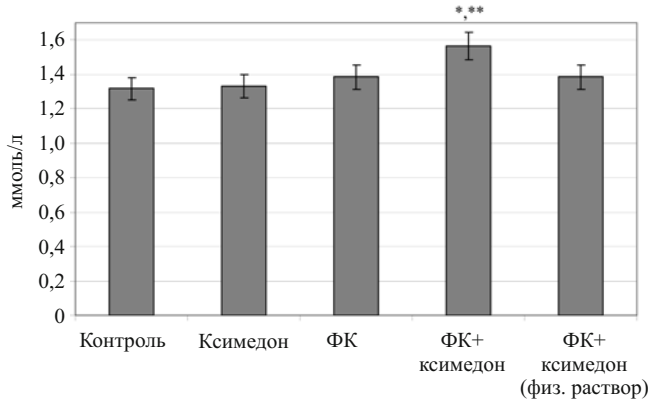

Рис. 6. Влияние фитиновой кислоты (ФК) и ее производных на концентрацию малонового диальдегида в плазме крови *in vitro*:

* — уровень статистической значимости различий $p < 0{,}05$ по отношению к контрольному образцу;
** — уровень статистической значимости различий $p < 0{,}05$ по отношению к образцу, в который вводили фитиновую кислоту.

В целях интегральной оценки эффектов рассматриваемых соединений в отношение про- и антиоксидантных систем крови нами проведен сравнительный анализ изменения общей антиоксидантной активности и светосуммы хемилюминесценции в двумерной системе координат (рис. 5). Установлено, что ксимедон, умеренно повышая первый параметр, практически не изменяет интенсивности процессов ПОЛ. Применение фитиновой кислоты способствует сбалансированному повышению светосуммы и антиоксидантной активности, что указывает на согласованность ответа про- и антиоксидантных систем крови здорового человека на данную фармацевтическую субстанцию. В связи с этим обнаруженные сдвиги уровня показателей могут рассматриваться как “адаптивные”, так как отражают физиологическую реакцию биологической жидкости на введение потенциального прооксиданта [8, 13].

Проведенный интегральный анализ позволил выявить принципиально разный характер ответа про- и антиоксидантных систем крови на комплексы “фитиновая кислота — ксимедон”, синтезированные в физиологическом растворе и в дистиллированной воде (рис. 5). В первом случае отчетливо просматриваются прооксидантные свойства соединения, о чем свиде-

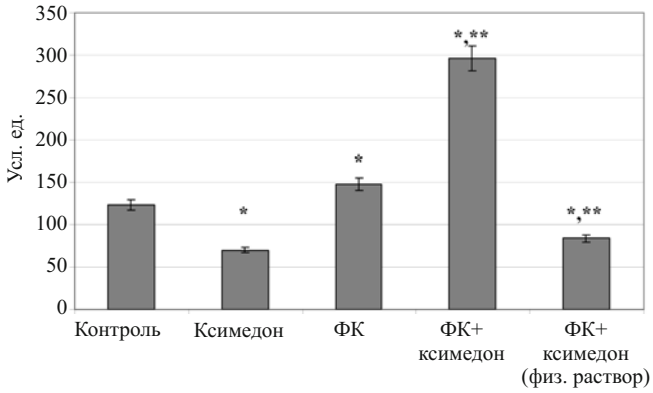

Рис. 8. Влияние фитиновой кислоты (ФК) и ее производных на активность СОД крови:

* — уровень статистической значимости различий $p < 0,05$ по отношению к контрольному образцу);
** — уровень статистической значимости различий $p < 0,05$ по отношению к образцу, в который вводили фитиновую кислоту.

тельствует значимое повышение интенсивности липопероксидации на фоне практически неизменной антиоксидантной активности плазмы крови данных образцов. При использовании в качестве растворителя дистиллированной воды нарастание светосуммы хемилюминесценции существенно менее выражено, чем при введении фитиновой кислоты в индивидуальном виде (20 и 38 % относительно контрольного образца соответственно; статистическая значимость различий между ними — $p < 0,05$). В то же время выраженность влияния последней и ее комплекса с ксимедоном, образованного в дистиллированной воде, на общую антиоксидантную активность плазмы крови практически идентичны.

Приведенные данные характеризуют рассматриваемый вариант комплекса “фитиновая кислота — ксимедон” как соединение, обладающее преимущественно антиоксидантными свойствами. Кроме того, установленные различия характера влияния комплексов “фитиновая кислота — ксимедон”, синтезированных на изотоническом растворе хлорида натрия и дистиллированной воде, подтверждают предположение о неодинаковости их химической структуры.

Для верификации и дополнения данных биохемилюминесцентного анализа нами также проведена оценка концентрации малонового диальдегида в плазме и эритроцитах всех образцов крови (рис. 6 и 7). Установлено, что только использование водного раствора комплекса “фитиновая кислота — ксимедон” обуславливает увеличение данного показателя в плазме крови, что рассматривается нами как проявление стимулирующего эффекта изучаемого соединения на состояние про- и антиоксидантных систем биологической жидкости (рис. 6).

В эритроцитах регистрировали снижение концентрации малонового диальдегида при действии фитиновой кислоты и её производного с ксимедоном (рис. 7). При этом в среде, дополнительно содержащей хлорид натрия, отмечали снижение уровня данного метаболита как по отношению к контрольному образцу, так и к образцу, в который вводили ксимедон. Следовательно, эффекты фитиновой кислоты и ее производных в отношении ПОЛ при введении соединений в образцы крови зависят от химической структуры вводимого соединения.

Известно, что одним из основных звеньев ферментной антиоксидантной системы является СОД [5, 11]. В связи с этим конкретизацию механизма действия тестируемых соединений осуществляли путём оценки её активности (рис. 8). Выявлено, что раствор ксимедона способствует умеренному, но значимому снижению указанного параметра ($p < 0,05$), тогда как при добавлении в образцы крови водных растворов фитиновой кислоты и её соединения с ксимедоном наблюдали выраженную стимуляцию каталитической активности СОД, в последнем случае достигающую 2,4 раза (лучше в %) по сравнению с контролем ($p < 0,05$ для обоих случаев). По нашему мнению, эти сдвиги характеризуют реализацию их антиоксидатных свойств.

Также выявлено, что образование комплекса “фитиновая кислота — ксимедон” в присутствии хлорида натрия демонстрирует умеренное угнетение активности энзима ($p < 0,05$). Данное обстоятельство дополнительно подтверждает наличие различий в химической структуре и свойствах комплексов, образованных в дистиллированной воде и физиологическом растворе, указывая на оптимальность первого варианта. Интересно, что во втором случае активность изучаемого фермента ниже не только уровня контрольного образца, но и пробы крови, в которую была введена фитиновая кислота ($p < 0,05$).

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что в условиях *in vitro* эффекты комплекса “фитиновая кислота — ксимедон” не являются простой суммой действия отдельных его компонентов и зависят и от условий его получения, в том числе наличия в матричном растворе хлорида натрия и, возможно, осмолярности последнего. Установлено, что по действию на процессы ПОЛ в плазме крови и мембранах эритроцитов водный раствор комплекса “фитиновая кислота — ксимедон” наиболее оптимален по сравнению с введением в биологическую жидкость фитиновой кислоты или ксимедона в индивидуальном виде, а также вариантом образования рассматриваемого соединения в присутствии хлорида натрия. Это проявляется в умеренной стимуляции ПОЛ в плазме крови на фоне превалирующей активации антиоксидантной активности, прежде всего обеспечиваемой модуляцией каталитических свойств антиоксидантных ферментов (в том числе СОД). Все это дает возможность предположить соответствующую фармакологическую активность комплекса, синтезированного в дистиллированной воде.

Таким образом, установлено, что ФК и комплекс “ФК — ксимедон”, полученный на дистиллированной

воде, способствуют активации антиоксидантных ферментов крови, оказывая влияние на потенциальные механизмы активации свободнорадикального окисления. В то же время ксимедон способствует угнетению активности СОД, проявляя при этом собственные антиоксидантные свойства и выступая в качестве "ловушки" свободных радикалов.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что введение в образцы крови *in vitro* раствора фитиновой кислоты (117,9 мкМ) приводит к умеренной стимуляции общей антиоксидантной активности биосреды (на 30 % относительно контроля) и активности СОД (+ 20 %) на фоне превалирования прооксидантного эффекта (увеличение интенсивности липопероксидации на 38 %).

2. Комплекс "фитиновая кислота — ксимедон", синтезированный на дистиллированной воде, оказывает выраженное антиоксидантное действие, проявляющееся в преимущественном нарастании антиоксидантных свойств плазмы крови над приростом интенсивности липопероксидации (30 % против 20 %), выраженной стимуляции активности СОД (+ 140 % по отношению к контролю) и снижению концентрации малонового диальдегида в эритроцитах (на 16 %).

3. Комплекс "фитиновая кислота — ксимедон", синтезированный на физиологическом растворе, демонстрирует прооксидантные свойства (увеличение интенсивности процессов ПОЛ на 29 % при сохранении уровня антиоксидантной активности и ингибировании каталитических свойств СОД (на 32 % относительно контроля).

ЛИТЕРАТУРА

1. В. В. Бесчастнов, С. Г. Измайлов, А. А. Ботяков и др., *Совр. технол. в мед.*, № 3, 21 – 26 (2011).
2. С. Ю. Гармонов, И. Э. Кравченко, Н. С. Шитова и др., *Хим.-фарм. журн.*, **42**(12), 3 – 7 (2008); Chem. Pharm. J., **42**(12), 659 – 664 (2008).
3. А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов, *Общая патофизиология*, ЭЛБИ-СПб, Санкт-Петербург (2001).
4. Р. К. Кадыров, *Вестник совр. клин. мед.*, **5**(3), 15 – 18 (2012).
5. В. А. Костюк, А. И. Потапович, *Биорадикалы и биоантиоксиданты*, БГУ, Минск (2004).
6. Е. И. Кузьмина, А. С. Нелюбин, М. К. Щенникова, *Биохимия и биофизика микроорганизмов*, Горький (1983), сс. 41 – 48.
7. К. В. Малышев, *Вестник хирургии им. И. И. Грекова*, № 4, 59 – 63 (2000).
8. А. К. Мартусевич, А. А. Мартусевич, А. Г. Соловьева, С. П. Перетягин, *Биофизика*, **59**(2), 369 – 372 (2014).
9. А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева, С. П. Перетягин, В. Н. Митрофанов, *Биомедицина*, № 1, 103 – 108 (2013).
10. Н. Б. Мельникова, Д. А. Пантелеев, О. Е. Жильцова и др., *Вестник Нижегород. универ. им. Н. И. Лобачевского*, № 5, 91 – 96 (2011).
11. Е. Б. Меньщикова, *Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания*, АРТА, Новосибирск (2008).
12. В. И. Погорельцев, В. Ю. Терещенко, А. А. Чиркин и др., *Казанский мед. ж.*, **86**(4), 346 – 348 (2005).
13. М. В. Сидорова, А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева, *Врач-аспирант*, № 2, 45 – 50 (2014).
14. Т. В. Сирота, *Вопросы мед. химии*, № 3, 263 – 272 (1999).
15. S. Abdelaziz, A. El-Saad, M. M. Hamada, *Evid. Based Complement Alternat Med.*, **6**(3), 331 – 341 (2009).
16. P. T. Hawkins, D. R. Poyner, T. R. Jackson. et al., *J. Biochem.*, **294**, 929 – 934 (1993).
17. J. Khatiwada, M. Verghese, Sh. Davis, L. L. Williams, *J. Med. Food*, **14**(11), 1313 – 1320 (2011).
18. K.-M. Lee, H.-S. Kang, Ch.-H. Yun, H.-Sh. Kwak, *Biomol. Ther. (Seoul)*, **20**(5), 492 – 498 (2012).
19. S. Miyamoto, K. Murota, G. Kuwataz, et al., *ACS Symposium Series; DC*, Washington (2002), pp. 241 – 250.
20. M. Sala, D. Makuc, J. Kolar, et al., *Carbohydrate Res.*, **346**, 488 – 494 (2011).

Поступила 11.07.14

EFFECT OF PHYTIC ACID AND ITS DERIVATIVES ON BLOOD LIPID PEROXYDATION STATE *IN VITRO*

A. K. Martusevich[1], M. V. Sidorova[2], N. B. Mel'nikova[2], A. G. Solov'eva[1], and S. P. Peretyagin[1]

[1] Nizhni Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Verkhne-Volzhskaya nab. 18/1, Nizhni Novgorod, 603155 Russia

[2] Nizhni Novgorod State Medical Academy, ul. Minina 10/1, Nizhny Novgorod, 603950 Russia

We have studied specific features of lipid peroxydation in whole human blood under the action of aqueous solutions of xymedone (19.6 μM), phytic acid (117.9 μM) and its complex (237.6 μM) synthesized in distilled water and isotonic (0.9%) solution of sodium chloride. The estimated parameters included lipid peroxidation (LPO) rate, total antioxidant potential, superoxide dismutase (SOD) level, and malonic dialdehyde (MDA) level in blood plasma and erythrocytes. It was established that the effect of phytic acid on blood samples includes moderate stimulation of total antioxidant activity and SOD activity with predominant prooxidant effect. The phytic acid – xymedone complex synthesized in distilled water exhibits an antioxidant action, while its synthesis in saline solution yields a prooxidant.

Keywords: phytic acid; xymedone; lipid peroxidation; malonic dialdehyde; superoxide dismutase