

КИНЕТИКА ИНИЦИИРОВАННОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПОСОМ ИЗ ФОСФАТИДИЛХОЛИНА С ВВЕДЕННЫМИ В НИХ ЭКСТРАКТАМИ АЛОЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ АНТИОКИСЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

© 2021 г. Н.Н. Сажина*, П.В. Лапшин**, Н.В. Загоскина**

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4

**Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, 127276, Москва, Ботаническая ул., 35

E-mail: Natnik48s@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.12.2020 г.

После доработки 10.01.2021 г.

Принята к публикации 20.01.2021 г.

Многочисленные виды растений рода *Aloe* привлекают внимание исследователей различными проявлениями их биологической активности, в том числе антиоксидантной. В настоящей работе проведено сравнительное исследование кинетики ингибирующего действия этанольных экстрактов пяти видов *Aloe* в модельной системе иницированного окисления фосфатидилхолиновых липосом. Установлено, что экстракты *A. marlothii* и *A. congolensis* обладают, соответственно, в 13 и 10 раз большей антиоксидантной активностью, чем традиционные виды *Aloe*: *A. arborescens* и *A. vera*. Значения суммарного содержания фенольных соединений экстрактов *A. marlothii* и *A. congolensis* превышают значения содержания фенольных соединений *A. arborescens* и *A. vera* в меньшей степени, чем антиоксидантная активность (в пять-шесть раз). Это может свидетельствовать о наличии в экстрактах *A. marlothii* и *A. congolensis* очень активных фенольных антиоксидантов. Анализ влияния введенных в липосомы экстрактов на их размер показал, что наиболее активные экстракты *A. marlothii*, *A. congolensis* и *A. pillansii* уменьшают средний размер липосом в сравнении с «чистыми» липосомами, а экстракты с меньшей антиоксидантной активностью увеличивают, что связано, вероятно, с различным изменением липидной структуры липосом компонентами экстрактов. Полученные результаты позволяют рекомендовать *A. marlothii*, *A. congolensis* и *A. pillansii* для изучения других видов их биологической активности и создания на их основе новых лекарственных средств.

Ключевые слова: *Aloe*, фенольные метаболиты, кинетика, окисление, липосомы, фосфатидилхолин.

DOI: 10.31857/S0006302921030108

В мире насчитывается более 500 различных видов рода *Aloe*. Они являются важными источниками биологически активных веществ [1]. К фитохимическим классам, присущим *Aloe*, относятся: антроны, хромоны, кумарины, пироны, алкалоиды, флаваноиды, стиролы, энзимы, протеины, жирные кислоты и другие липидные компоненты, практически все витамины (В₁, В₂, В₆, В₁₂, С, Е, бета-каротин и др.) [1]. Благодаря разному биологическому действию соединений этих классов, *Aloe* широко применяют в традиционной и современной медицине [2]. При лечении гепатита и алкогольной интоксикации печени используются гепатопротекторные свойства *Aloe* [3, 4]. Благодаря пребиотической и антибактериальной активности в гастроэнтерологии сок и экс-

тракты *Aloe* помогают лечить гастриты и язвы желудка [5]. Антидиабетическая и антигиперлипидемическая активности компонент *Aloe* позволяют бороться с сахарным диабетом и жировой болезнью печени [6]. Отдельные компоненты *Aloe* (алоэ-эмодин, алоин и др) обладают антивирусной, иммуномодулирующей активностями и используются для лечения заболеваний верхних дыхательных путей [1, 7]. Некоторые соединения *Aloe* обладают противоопухолевой активностью [8, 9]. Было найдено, что алоэ-эмодин, один из основных компонентов *Aloe*, ингибирует активность ацетилхолинэстеразы, а экстракт *A. arborescens* защищает IMR32, нейробластому клеточной линии человека, от токсичности, вызванной бета-амилоидным пептидом, ответственным за болезнь Альцгеймера [2, 10].

Одна из причин и стадий перечисленных болезней — окислительный стресс, обусловленный перекисным окислением липидов в мембранах

Сокращения: АОА — антиоксидантная активность, ФХ — фосфатидилхолин, ААРН — 2,2'-азо-бис(2-амидинопропан)дигидрохлорид, СФС — суммарное содержание фенольных соединений, ДК — диеновые конъюгаты.

клеток крови, печени, мозга, эпителия и других, поэтому для ингибирования окислительного процесса важно найти *Aloe* с высоким содержанием активных антиоксидантов. Наиболее исследованными и используемыми видами *Aloe* являются *Aloe arborescens* Mill., *Aloe ferox* Mill. и *Aloe vera* (L.) Burm. [1]. Однако встречаются мало изученные виды с более активными антиоксидантными компонентами. В работе [11] амперометрическим и хемилюминесцентным методами был проведен скрининг 15 видов *Aloe* по оценке антиоксидантной активности (АОА) их экстрактов и найден вид *Aloe A. pillansii* со значительно более высоким значением АОА, чем у традиционных видов *Aloe*. Поиск продуцентов биологически активных веществ с высокими антиокислительными свойствами в других видах *Aloe* востребован и является актуальной задачей современной биологии и фармацевтики.

В настоящее время для исследования биохимических процессов в мембранах клеток живых организмов, в частности процесса перекисного окисления липидов, широко используют различные липосомные структуры как модели биомембран [12–15]. Иницируя окисление липосом разными способами, можно регулировать окислительный процесс различными субстанциями, встроенными в липосомы. Ингибирование окисления липосом антиоксидантами дает более реальную «физиологичную» модель для определения их АОА. Поэтому в нашей работе мы использовали модельную систему иницированного окисления липосом из соевого фосфатидилхолина (ФХ) при $T = 37^\circ\text{C}$ [14–16]. Кроме использования в качестве модели биологических мембран, липосомы из ФХ можно использовать также как потенциальные наноконтейнеры для доставки в ткани и клетки живых организмов различных лекарственных препаратов, в том числе и экстрактов *Aloe*, поэтому целесообразно определить физико-химические характеристики таких липосом [12, 17–19].

Цель настоящей работы – изучение кинетики ингибирующего действия экстрактов пяти видов рода *Aloe* на модели иницированного окисления липосом из ФХ и определение их АОА, а также сравнение размеров и ζ -потенциала липосом с введенными в них экстрактами *Aloe*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение экстрактов *Aloe*. В работе использовали пять представителей рода *Aloe*: *A. arborescens*, *A. vera*, *A. pillansii*, *A. congolensis*, *A. marlothii*, выращенных в коллекции суккулентных растений в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (Москва) при естественном освещении и 16-часовом фотопериоде. Листья взрослых (годовалых) растений измельчали до фрагментов

размером ≈ 5 мм и лиофильно высушивали до получения сухой массы. Экстракты готовили из 50 мг сухих листьев в 1.5 мл 70%-го этанола, перемешивали в термостате в течение 45 мин при температуре 45°C [20]. Далее центрифугировали с относительным ускорением 12000 g (13000 об/мин) на центрифуге Hettich (Германия) и отбирали надосадочную жидкость (супернатант). Готовые экстракты хранили при 4°C . Весовая концентрация всех полученных экстрактов составила 33.3 мг сухих листьев на 1 мл этанола. В качестве вещества сравнения использовали галловую кислоту (Sigma-Aldrich, США). Суммарное содержание фенольных соединений (СФС), выраженное в мг-экв галловой кислоты на 1 г сухих листьев, определяли спектрофотометрическим методом (725 нм) с помощью реактива Фолина–Чокальтеу [20]. Погрешность определения СФС составила менее 3%.

Приготовление суспензии липосом. Для приготовления липосом использовали суспензию соевого ФХ марки L- α -phosphatidylcholine P3644 (Sigma-Aldrich, США) в фосфатном буфере ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) с pH 7.4 и ионной силой 1 мМ. В состав ФХ данной марки входили два основных фосфолипида – фосфатидилхолин (55%) и фосфатидилэтаноламин (25%). Содержание ЖК в % к общему их количеству составило: пальмитиновая – 17%, стеариновая – 4%, олеиновая – 9%, линолевая – 60%, линоленовая – 7%. Суспензию готовили из навески ФХ с объемом буфера, необходимым для получения концентрации 1 мг/мл. Смесь перемешивали в шейкере, добавляя разные объемы (от 10 до 100 мкл) спиртовых экстрактов *Aloe*. Липосомы формировали с помощью ультразвукового гомогенизатора VCX-130 (Sonic & Materials, США) при мощности 70 Вт в течение 15 мин в режиме $15\text{ с} \times 15\text{ с}$, для предохранения липосом от окисления сосуд с суспензией помещали в смесь воды со льдом. Для отделения липосом от примесей, образующихся, в том числе, и после «озвучивания», дисперсию липосом центрифугировали на центрифуге Hettich (Германия), при 12000 g (13000 об/мин) и 4°C в течение 20 мин, а супернатант отбирали для дальнейшей работы [16, 21]. Для определения концентрационных зависимостей ингибирующего действия экстрактов *Aloe* мы ввели величину содержания сухих листьев в известном объеме экстракта, введенного в суспензию липосом, к массе ФХ в липосомах $C = m_{\text{С.л}}/m_{\text{ФХ}}$, где $m_{\text{С.л}}$ – масса сухих листьев в введенном объеме экстракта в мг, $m_{\text{ФХ}}$ – масса навески ФХ в мг.

Иницирование окисления липосом. Для иницирования окисления липосом использовали водорастворимый азо-инициатор 2,2'-азобис(амидинопропан)дигидрохлорид (AAPH; Fluka, Германия) с конечной концентрацией в дис-

персии липосом 0.33 мМ. Исходный раствор ААРН (200 мМ) готовили на дистиллированной воде при $T \approx 0^\circ\text{C}$ и хранили в морозильнике. Перед измерением разбавляли в десять раз буферным раствором в сосуде, помещенном в лед, из которого отбирали 50 мкл для анализа. Окисление липосом с концентрацией ФХ 0.1 мг/мл проводили в спектрофотометрической кварцевой кювете с конечным объемом рабочей жидкости 3 мл, термостатированной при физиологической температуре (37°C). Кинетику увеличения оптической плотности ΔA ($A - A_0$), т.е. приращения образования диеновых конъюгатов (ДК) в процессе перекисного окисления липидов, регистрировали во времени при $\lambda = 234$ нм на двухлучевом спектрофотометре (Perkin Elmer, США). Для исключения влияния спектра поглощения ААРН в кювету сравнения добавляли такое же количество ААРН, как и в рабочую кювету, а вместо дисперсии липосом – такой же объем буфера. Добавление 100 мкл 70%-го этанола вместо экстрактов при формировании «чистых» липосом не изменяло параметры окисления по сравнению с «бесспиртовыми» липосомами в пределах ошибки измерений.

Основными показателями, которые использовали при изучении кинетики образования ДК, были: τ – период индукции, V_m – максимальная скорость окисления, t_m – время достижения V_m [16, 27]. Спектры поглощения этанольных экстрактов *Алое* регистрировали в диапазоне 200–700 нм на вышеупомянутом спектрофотометре.

Метод динамического светорассеяния. Для определения среднего размера липосом в суспензии использовали метод динамического светорассеяния. Измерения проводили на высокочувствительном приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) по оценке корреляционной функции флуктуаций интенсивности лазерного излучения с $\lambda = 633$ нм, рассеянного на липосомах под углом 173° [21]. Концентрация ФХ-липосом с введенным экстрактами *Алое* составляла ≈ 0.5 мг/мл, температура 25°C , индекс полидисперсности варьировал в пределах 0.23–0.25. Для каждой пробы осуществляли регистрацию пяти-семи распределений интенсивности по размерам частиц, усреднение проводили по размерам частиц с максимальной интенсивностью рассеяния с погрешностью не более $\pm 5\%$. При измерении ζ -потенциала липосом прибор использовали в режиме регистрации электрофоретической подвижности частиц, по которой рассчитывали распределение для ζ -потенциала. Усреднение максимальных значений ζ -потенциала проводили по трем повторным измерениям. Калибровку проводили по стандартной дисперсии полистирольного латекса с погрешностью

$\pm 5\%$. Суммарная ошибка составляла не более $\pm 10\%$.

Методы статистической обработки. Результаты экспериментов представлены как средняя величина \pm стандартная ошибка средней при помощи программного пакета Microsoft® Office Excel. Статистическую обработку результатов измерений осуществляли с использованием t -критерия Стьюдента [22]. Различия считали статистически достоверными при уровне различия $p \leq 0.05$. Измерения повторяли не менее трех раз. Погрешность определения ингибирующей активности экстрактов *Алое* не превышала 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сначала были изучены спектры поглощения этанольных экстрактов всех исследованных видов *Алое* (рис. 1). Они существенно различались между собой. Наибольшее поглощение компонентами всех экстрактов наблюдается в диапазоне 200–400 нм, что характерно для фенольных соединений [20]. Это относится к таким веществам, содержащимся в листьях *Алое*, как алоин, алоэнин, алоэ-эмодин, алоэзин, алоэрезин, алоэнозид и др. [23–26]. Для *A. arborescens* содержание алоэнина составляет 20.7% от суммы фенольных соединений, на долю алоинов приходится 26.2% [24]. Для *A. arborescens* и *A. vera*, эти фенольные метаболиты определяют, главным образом, антирадикальную активность [25, 26]. Спектры поглощения трех чистых метаболитов *Алое* приведены в работе [23]. Для алоэнина максимумы полос поглощения 218 и 308 нм, для алоэрезина – 216 и 302 нм, у барбалоина – четыре пика поглощения: при 226, 270, 298 и 360 нм [23]. Сопоставление этих и наших данных (рис. 1) позволяет качественно оценить вклад указанных фенольных метаболитов в спектральные характеристики экстрактов исследуемых видов *Алое*. Так, основной максимум поглощения этанольного экстракта листьев *A. arborescens* (спектр 1) отмечен около 300 нм, что может свидетельствовать о наличии в нем алоина, алоэнина, алоэрезина, как и отмечалось в [23, 24]. Для этанольного экстракта листьев *A. pillansii* (спектр 3) характерны три ярко выраженные полосы поглощения в области 270, 300 и 360 нм, что предполагает наличие в нем не только алоина, алоэнина, алоэрезина, но и других фенольных метаболитов. Похожий спектр поглощения имеет экстракт *A. vera* (спектр 2), однако концентрации его составляющих в полтора-два раза меньше. Для экстракта *A. marlothii* (спектр 5) можно отметить две полосы поглощения вблизи 300 и 250 нм. Экстракт *A. congolensis* (спектр 4) имеет очень высокий пик вблизи 230 нм. Возможно, в этом случае доминирует максимум поглощения барбалоина, присутствующего в высокой концентрации, на фоне поглощения алоэнина,

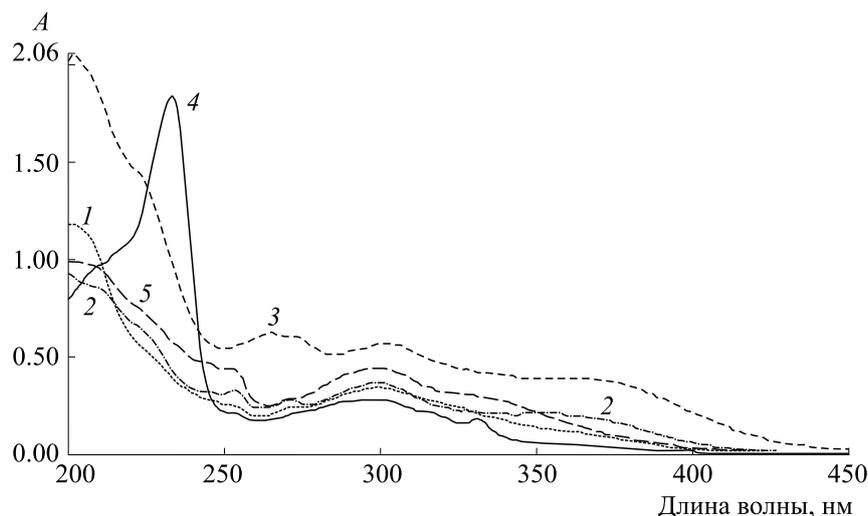


Рис. 1. Спектры поглощения 70%-х этанольных экстрактов пяти видов *Алоэ*: 1 – *A. arborescens*, 2 – *A. vera*, 3 – *A. pillansii*, 4 – *A. congolensis*, 5 – *A. marlothii*. Разведение в 200 раз.

алоэрезина и других близких метаболитов. Не исключено также наличие во всех изученных экстрактах антронов, антрохинонов, алоэсапонаринов, производных эмодаина, также имеющих несколько полос поглощения в этой области спектра [1].

Определение суммарного содержания фенольных соединений в изученных экстрактах (СФС в мг-экв галловой кислоты на 1 г сухого листа) показало небольшие и близкие их значения для *A. arborescens* и *A. vera* (рис. 2). В экстрактах остальных видов их уровень был в пять-шесть раз выше. Исходя из этих данных, можно отметить высокую способность к биосинтезу вторичных фенольных метаболитов у *A. pillansii*, *A. marlothii* и *A. congolensis* в сравнении с «традиционными» видами *Алоэ*.

Следующим этапом нашего исследования явилось изучение процессов инициированного окисления липосом из ФХ и ингибирования окисления экстрактами *Алоэ*, введенными в липосомы. Механизм и соответствующие уравнения инициированного ААРН радикально-цепного окисления жирных кислот (ЖК) в липосомах подробно рассмотрены в работах [14, 16, 27, 28]. На рис. 3 представлены сравнительные кинетические кривые образования ДК (в процессе инициированного окисления липосом без экстракта *Алоэ* и с включенными в них экстрактами пяти видов *Алоэ* с равными значениями $C = m_{\text{С.Л.}}/m_{\text{ФХ}}$, где $m_{\text{С.Л.}}$ – масса сухих листьев в введенном в липосомы объеме экстракта в мг, $m_{\text{ФХ}}$ – масса ФХ в липосомах в мг.

При одинаковых значениях C значительно более продолжительные периоды индукции демонстрируют экстракты 5 (*A. marlothii*) и 4 (*A. con-*

golensis) (см. рис. 3). Накопление ДК в максимуме кривой 5 несколько выше, чем у других (~10%), что, возможно, связано с присутствием в экстракте *A. marlothii* фитостеролов или других липидных субстратов [1]. Максимальная скорость окисления липосом, от которой зависит τ , заметно снижается у кривых 4 и 5 по сравнению с остальными кривыми, что в значительной степени связано с расходом к этому времени ненасыщенных липидов ФХ, от концентрации которых главным образом и зависит скорость окисления [16, 27, 28]. При больших временах окисления на скорость может влиять также снижение концентрации ААРН [27]. Учитывая величину молярного коэф-

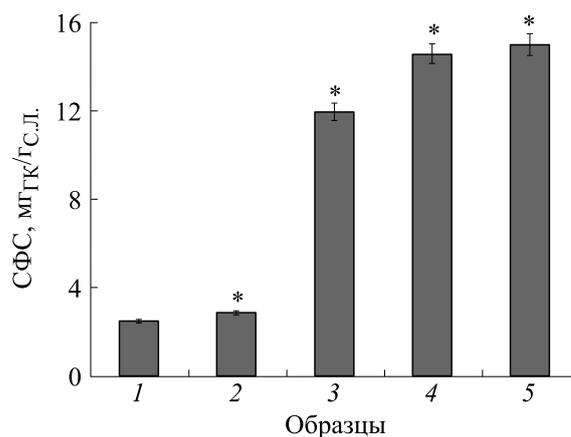


Рис. 2. Содержание фенольных соединений (СФС, в мг-экв галловой кислоты на г сухого листа) в этанольных экстрактах листьев изученных видов *Алоэ*: 1 – *A. arborescens*, 2 – *A. vera*, 3 – *A. pillansii*, 4 – *A. congolensis*, 5 – *A. marlothii*; * – $p < 0.05$ по отношению к образцу 1.

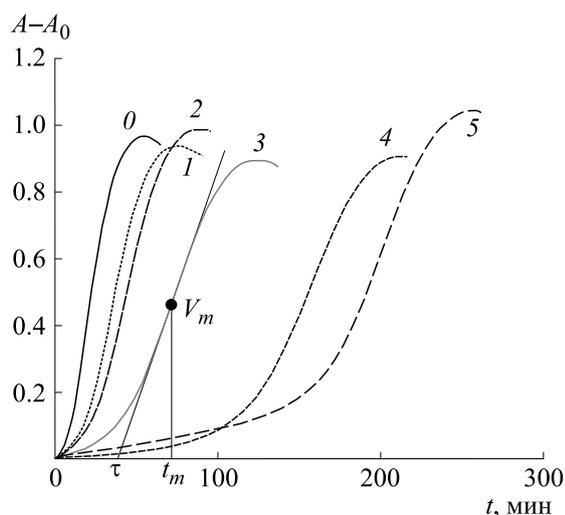


Рис. 3. Кинетика образования ДК в процессе инициированного окисления ФХ-липосом: 0 – без введения в них экстрактов, с введенными экстрактами: 1 – *A. arborescens*, 2 – *A. vera*, 3 – *A. pillansii*, 4 – *A. congolensis*, 5 – *A. marlothii*, [ФХ] = 0.1 мг/мл, [ААРН] = 0.33 мМ, $C = 0.14$ мг_{С.Л.}/мг_{ФХ}, $T = 37^\circ\text{C}$, A – оптическая плотность ДК при 234 нм, A_0 – оптическая плотность при $t = 0$ мин, V_m – максимальная скорость окисления, t_m – время достижения V_m , τ – период индукции.

коэффициента поглощения ДК при $\lambda = 234$ нм, равную $274000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [15, 16], по наклону касательной можно определить максимальную скорость V_m формирования ДК для всех кинетических кривых на рис. 3 (см. таблицу). Максимальная скорость окисления липосом с включенным экстрактом 4 (*A. congolensis*) снижается по сравнению с V_m для

липосом с экстрактом 1 (*A. arborescens*) примерно в два раза. Если учесть, что $\tau = t_m - (A - A_0)_m / V_m$ (рис. 3), то оценки влияния снижения V_m на τ показывают, что для больших значений t_m (рис. 3, кривые 4 и 5) эти изменения для τ не очень значительны (~5–7%) и меньше общей погрешности определения АОА.

Для сравнения степени ингибирования окисления липосом экстрактами *Aloe* мы приняли безразмерный параметр $(\tau - \tau_0) / \tau_0$, где τ_0 – период индукции в отсутствие экстрактов для кривой 0 ($\tau_0 = (5.0 \pm 0.5)$ мин), обусловленный кинетикой процесса накопления ДК и зависящий от концентраций ФХ и ААРН [16, 27–29]. Для ААРН скорость инициирования радикалов $R_i = k_i[\text{AAPH}]$, где $k_i = 1.3 \cdot 10^{13} \cdot e^{-112600/RT}$ – константа скорости этой реакции [29]. При $T = 37^\circ\text{C}$, $k_i = 1.36 \cdot 10^{-6} \text{ c}^{-1}$. Согласно законам жидкофазного окисления углеводородов и липидов с квадратичным обрывом цепей, при неингибированном окислении скорость образования ДК (гидропероксидов НР) $d[\text{НР}]/dt = k_p / (2k_t)^{0.5} \cdot [\text{LH}] \cdot R_i^{0.5}$, где k_p и k_t – эффективные константы скорости продолжения и обрыва цепей окисления, [LH] – концентрация окисляемых липидов. Для ингибированного окисления $d[\text{НР}]/dt = k_p / 2k_i[\text{AO}] \cdot [\text{LH}_0] \cdot R_i$, где [AO] – концентрация ингибитора (антиоксиданта). Если [AO] снижается линейно со временем ($[\text{AO}] = [\text{AO}]_0 - R_i t / f$), то по окончании ингибирования $[\text{AO}] = 0$, а $t = \tau$, и для разных кинетических кривых на рис. 3 можно сделать сравнительные оценки величин $f \cdot [\text{AO}]_0 = R_i \tau$, где f – стехиометрический коэффи-

Результаты экспериментов после их статистической обработки

№ образца и вид <i>Aloe</i>	$V_m \pm \text{SD}$, нМ/мин	$[\text{AO}]_0 f \pm \text{SD}$, мкМ	$y = a_n x + b$	АОА $\pm \text{SD}$, нмоль $\text{Tг}_{\text{ЭКВ}}/\text{мг}_{\text{С.Л.}}$
0	117.2 ± 1.2	–	–	–
1. <i>A. arborescens</i>	91.2 ± 1.5	0.43 ± 0.03	$y = 73.88x + 0.91$ $r^2 = 0.9899$	22.8 ± 2.0
2. <i>A. vera</i>	$80.3 \pm 2.7^*$	$0.54 \pm 0.03^*$	$y = 96.04x + 0.20$ $r^2 = 0.9977$	$30.2 \pm 2.1^*$
3. <i>A. pillansii</i>	$54.7 \pm 1.7^*$	$1.38 \pm 0.04^*$	$y = 357.02x + 1.12$ $r^2 = 0.9941$	$112.3 \pm 8.6^*$
3. <i>A. congolensis</i>	$43.8 \pm 2.9^*$	$2.94 \pm 0.04^*$	$y = 732.87x - 1.63$ $r^2 = 0.9984$	$230.2 \pm 9.1^*$
3. <i>A. marlothii</i>	$47.4 \pm 3.2^*$	$4.08 \pm 0.05^*$	$y = 996.65x + 2.11$ $r^2 = 0.9983$	$310.4 \pm 11.2^*$

Примечание. В таблице представлены: максимальная скорость окисления (V_m) на кривых, показанных на рис. 3; величины $[\text{AO}]_0 f$ и уравнения регрессии $y = a_n x + b$ ($n = 1-5$) для зависимостей $(\tau - \tau_0) / \tau_0$ от C (рис. 4); значения антиоксидантной активности. Показатели V_m , АОА и $[\text{AO}]_0 f$ выражены как среднее \pm стандартное отклонение; * – $p < 0.05$ по отношению к показателям образца 1.

коэффициент ингибирования, $[AO]_0$ – «эффективная» начальная концентрация антиоксиданта в образце. При $[AAPH] = 0.33$ мМ, $R_i = 0.45$ нМ/с. Расчет $f[AO]_0$ для исследуемых экстрактов приведен в таблице. Все величины выражены как средняя величина \pm стандартная ошибка средней.

Зависимости параметра $(\tau - \tau_0)/\tau_0$ от (C) представлены на рис. 4.

В указанных пределах C эти зависимости линейны ($p < 0.01$), а наклон их определяет ингибирующую (антиокислительную) активность экстрактов *Алоэ*. Из этих зависимостей были получены соответствующие уравнения регрессии ($y = ax + b$) для пяти образцов липосом (см. таблицу).

Для выражения ингибирующей (антиоксидантной) активности экстрактов *Алоэ* в эквивалентах тролокса ($Tg_{ЭКВ}$) была проведена калибровка с этанольным раствором тролокса ($C = 1$ мМ), вводимом в известных объемах (V) в липосомы. АОА исследуемых образцов определялась по калибровочной прямой зависимости $(\tau - \tau_0)/\tau_0$ для тролокса от его удельного содержания в ФХ-липосомах ($C \cdot V$, нмоль $Tg/m_{ФХ}$, мг). В таблице представлены результаты определения АОА изученных экстрактов в $Tg_{ЭКВ}$, т.е. в нмоль $Tg_{ЭКВ}/мг_{С.Л.}$

Как видно из таблицы, по значениям АОА липодируют образцы 5 (*A. marlothii*) и 4 (*A. congolensis*), они имеют антиокислительную активность в 13 и 10 раз выше по сравнению с *A. arborescens*, однако значение СФС у них только в 5–6 раз выше, чем у *A. arborescens* (рис. 2), а «эффективная» концентрация $f[AO]_0$ – в 9 и 6 раз. Для образца 3 (*A. pillansii*) эта разница сглаживается: СФС и АОА больше этих величин для *A. arborescens* в 4.4 и в 4.8 раза, причем спектр экстракта *A. pillansii* заметно выше остальных, что свидетельствует о главном вкладе в АОА этого экстракта активных фенольных соединений. Все это свидетельствует о сложном антиоксидантном профиле в экстрактах этих растений и значительной разнице в АОА составляющих их фенольных компонентов.

В разных модельных системах фенольные метаболиты *Алоэ* проявляют, как правило, неодинаковую АОА. На модели со стабильным ДФПГ-радикалом и методом ORAC (oxygen-radical absorbing capacity) для экстрактов разных частей листьев *A. arborescens* были определены значения антирадикальной активности [25, 30–32]. Для экстрактов из целых листьев *A. arborescens* значения антирадикальной активности составили 71 мкМ $Tg_{ЭКВ}$ с ДФПГ-радикалом и 2671 мкМ $Tg_{ЭКВ}$ в ORAC-си-

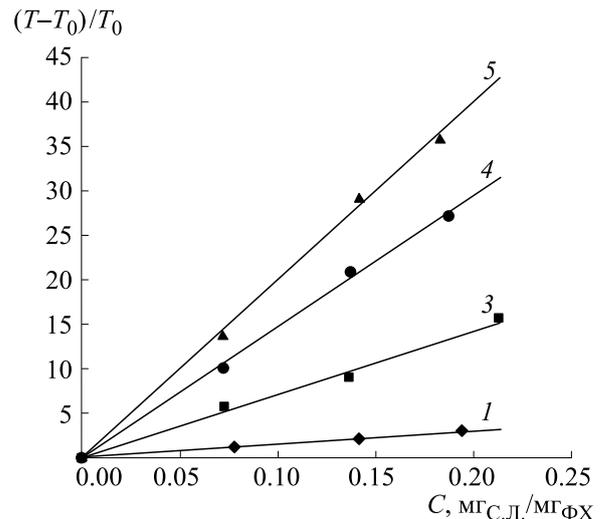


Рис. 4. Зависимости $(\tau - \tau_0)/\tau_0$ от удельного содержания сухих листьев в экстракте, введенном в липосомы, к массе ФХ в липосомах (C , мг_{С.Л.}/мг_{ФХ}) для: 1 – *A. arborescens*, 3 – *A. pillansii*, 4 – *A. congolensis*, 5 – *A. marlothii*. Для *A. vera* эта зависимость практически совпадает с зависимостью 1, поэтому не приведена.

стеме. Такая разница объясняется значительным отличием в этих системах активности к захвату радикалов ДФПГ и ААРН разными фенольными метаболитами. На этих моделях определены также антирадикальные активности чистых вторичных фенольных метаболитов – алоина, алоэ-эмодин, алоэрезина, алоэзина А, алоэзона, алоэнина А. Для первого метода самыми активными оказались алоэзон, алоэзин, алоэ-эмодин (351, 343 и 222 мкМ $Tg_{ЭКВ}$), для второго – алоэрезин А и алоэ-эмодин (144 и 116 мкМ $Tg_{ЭКВ}$), остальные метаболиты проявили в 2–30 раз меньшую антирадикальную активность [25]. Алоин, считающийся главным антиоксидантом в *Алоэ*, показал в ДФПГ-системе меньшую антирадикальную активность (90 мкМ $Tg_{ЭКВ}$), как и в системе ORAC (84 мкМ $Tg_{ЭКВ}$) [25]. Масс-спектроскопический скрининг *A. arborescens* [25] и *A. vera* [25,33] выявил такие классы антиоксидантов, как антроны (алоин, алоэсапонарин), пироны (алоэнин), хромоны (алоэзин, алоэрезин), флавоны, гидроксикислоты (хлорогеновая, феруловая, кофейная) и др. [33].

Для нашей модельной системы в свободно-радикальных цепных реакциях инициированного окисления ненасыщенных липидных компонентов в бислое липосом кроме пероксидного радикала (инициатора ААРН) образуются промежуточные радикальные интермедиаты жирных кислот фосфолипидов (алкильные, пероксильные и

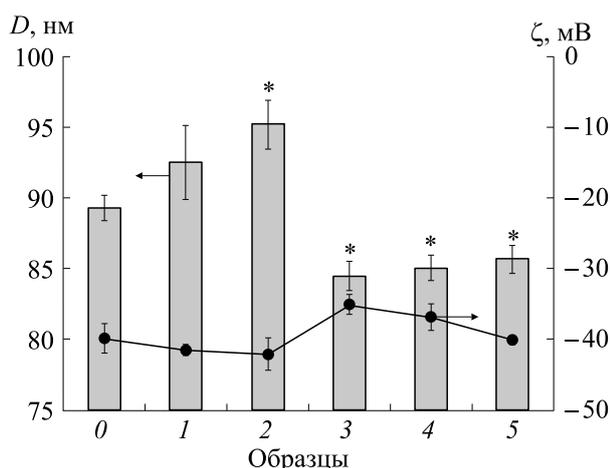


Рис. 5. Средний размер (D , показан столбиками на диаграмме) и ζ -потенциал липосом: 0 – без экстрактов, 1 – *A. arborescens*, 2 – *A. vera*, 3 – *A. pillansii*, 4 – *A. congolensis*, 5 – *A. marlothii*, $C = 0.14$ мг_{С.Л}/мгФХ, [ФХ] = 0.5 мг/мл; * – $p < 0.05$ по отношению к образцу 0.

др. радикалы), с которыми взаимодействуют антиоксиданты экстрактов и обрывают цепь окисления [15, 16, 27, 28]. Подобные реакции происходят и в мембранах клеток живых организмов [34], поэтому ингибирование окисления липосом антиоксидантами при $T = 37^\circ\text{C}$ дает более реальную «физиологичную» модель для определения АОА различных соединений. Наблюдаемое в нашей работе значительное превышение АОА *A. marlothii* и *A. congolensis* над АОА *A. arborescens* и *A. vera* может свидетельствовать о наличии в листьях этих видов *Aloe* фенольных метаболитов с высокой ингибирующей активностью в сложных свободно-радикальных процессах, протекающих в процессе перекисного окисления липидов.

Введение экстрактов *Aloe* в липосомы приводит к перераспределению компонентов *Aloe* в разных частях липосомы: в липидном бислое локализуются липофильные соединения, а в центральной части гидрофильные. Это приводит к изменению структуры бислоя липосом и их физико-химических характеристик [35, 36], в частности размера и поверхностного заряда (ζ -потенциала) [21, 37]. Эти характеристики для липосом с экстрактами *Aloe*, введенными в липосомы, представлены на рис. 5.

Можно отметить, что наиболее активные экстракты (экстракты 3, 4 и 5) достоверно уменьшают средний размер липосом в сравнении с «чистыми» липосомами, в то время как экстракты с меньшей АОА (экстракты 1 и 2) увеличивают размер липосом. Эта тенденция сохраняется и для других значений удельной концентрации. Размер

«чистых» липосом зависит, главным образом, от условий их приготовления и жирнокислотного состава используемого ФХ и уменьшается с увеличением в нем процентного содержания полиненасыщенных ЖК [38]. С введением в липосомы экстрактов *Aloe* их жирорастворимые компоненты встраиваются в различные области липидного слоя липосом [35, 36, 39]. Они могут взаимодействовать с группами липидных полярных головок на границе раздела «липид–вода» мембран и защищать липидный бислой от агрессивных молекул. Если повреждающая молекула является окислителем, этот защитный эффект может способствовать общему антиоксидантному действию экстракта. «Ригидификация» липидной мембраны компонентами экстракта может препятствовать диффузии в нее кислорода и радикалов ААРН, снижая скорость окислительных реакций и повышая ингибирование окисления липидов. Возможно, с таким изменением структуры липидного бислоя и связано уменьшение среднего размера липосом, наблюдаемое нами для экстрактов 3, 4 и 5 (рис. 5). Компоненты экстракта 2, по-видимому, проявляют противоположный эффект при встраивании в липидный слой, как бы «разрыхляя» его и увеличивая размер липосом.

Уплотнение липидного бислоя активными компонентами экстрактов 3 и 4 приводит к перестройке его структуры и, возможно, переориентации и перегруппировке фосфолипидов в нем, что приводит к уменьшению абсолютной величины отрицательного ζ -потенциала соответствующих липосом по сравнению с этим значением для «чистых» липосом [21]. Для экстрактов 1 и 2 наблюдается небольшое ($\approx 5\%$) увеличение отрицательного ζ -потенциала липосом, однако это только тенденция, достоверного различия нет.

ВЫВОДЫ

Проведено сравнительное исследование кинетики ингибирующего действия этанольных экстрактов пяти видов *Aloe* в модельной системе ААРН-индуцированного окисления липосом из ФХ и выявлены новые виды *Aloe*: *A. marlothii* и *A. congolensis*, обладающие, соответственно, в 13 и 10 раз большей антиоксидантной активностью, чем традиционные виды *Aloe*: *A. arborescens* и *A. vera*. Значения суммарного содержания фенольных соединений в исследуемых экстрактах *Aloe* различаются только в 5–6 раз для *A. arborescens* и *A. marlothii* и *A. congolensis*, что может свидетельствовать о наличии в последних активных фенольных антиоксидантов в высоких концентрациях. Проведен анализ спектров поглощения

изученных экстрактов на основе спектров поглощения основных индивидуальных фенольных метаболитов *Алое*, который показал значительную разницу в составе изученных видов *Алое*. Установлено влияние введенных в липосомы экстрактов на их размер: наиболее «активные» экстракты *A. marlothii*, *A. congolensis* и *A. pillansii* уменьшают средний размер липосом в сравнении с «чистыми» липосомами, а экстракты с меньшей АОА увеличивают, что, вероятно, связано с изменением липидной структуры липосом компонентами экстрактов.

Результаты работы позволяют рекомендовать *A. marlothii*, *A. congolensis* и *A. pillansii* для более глубокого изучения их биологической активности и создания на их основе различных медицинских препаратов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. Salehi, S. Albayrak, H. Antolak, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2843. (2018).
2. M. Akaberi, Z. Sobhani, B. Javadi, et al., *Biomedicine & Pharmacotherapy* **84**, 759 (2016).
3. D. I. Sánchez-Machado, J. López-Cervantes, R. Sendón, A. Sanches-Silva, *Trends Food Sci. Technol.* **61**, 94 (2017).
4. E. Misawa, M. Tanaka, K. Nomaguchi, et al., *Agric. Food. Chem.* **60**, 2799 (2012).
5. I. Cock, In *Novel Natural Products: Therapeutic Effects in Pain, Arthritis and Gastro-intestinal Diseases*, Ed. by K. Rainsford, M. Powanda, and M. Whitehouse (Springer, Basel, 2015), pp. 179–235.
6. N. Ghannam, M. Kingston, I. A. Al-Meshaal, et al., *Horm. Res. Pediatr.* **24**, 288 (1986).
7. R. Lawrence, P. Tripathi, and E. Jeyakumar, *Braz. J. Microbiol.* **40**, 906 (2009).
8. Q. Pan, H. Pan, H. Lou, et al., *Cancer Cell Int.* **13**, 69 (2013).
9. S.-Y. Lin, W.-W. La, C.-C. Ho, et al., *Anticancer Res.* **29**, 327 (2009).
10. M.E. Clement, G. Tringali, D. Triggiani, B. Giardina, *Nat. Prod. Commun.* **10** (11), 1993 (2015).
11. Н. Н. Сажина, П. В. Лапшин и Н. В. Загоскина, *Химия растит. сырья*, № 2, 169 (2015).
12. N. P. Palmina, E. L. Maltseva, V. I. Binjukov, et al., *Biophysics* **63** (1), 53 (2018).
13. A. H. Thomas, A. Catala, and M. Vignoni, *Biochim. Biophys. Acta* **1858**, 139 (2016).
14. M. Mosca, A. Cerlie, and L. Ambrosone, *Chemistry and Physics of Lipids* **164**, 158 (2011).
15. A. V. Lokhmatikov, N. Voskoboynikova, D. A. Cherepanov, et al., *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **1**, 1 (2016).
16. N. N. Sazhina, A. S. Antipova, M. G. Semenova, and N. P. Palmina, *Rus. J. Bioorg. Chem.* **45** (1), 34 (2019).
17. N. Kuznetsova, A. Kandyba, V. Vostrov, et al., *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **19** (1), 51 (2009).
18. M. G. Semenova, *Food Hydrocolloids* **68**, 114 (2017).
19. M. G. Semenova, A. S. Antipova, L. E. Belyakova, et al., *Food Hydrocolloids* **42**, 149 (2014).
20. М. Н. Запрометов, *Фенольные соединения и методы их исследования. Биохимические методы в физиологии растений*, (М.: Наука. 1971). 185.
21. Н. Н. Сажина, И. Г. Плащина, М. Г. Семенова и Н. П. Пальмина, *Коллоид. журн.* **82** (1), 89 (2020).
22. К. Дерффель, *Статистика в аналитической химии* (Мир, М., 1994).
23. Y. Gutterman and E. Chauser-Volfson, *Biochemical Systematics and Ecology* **28** (9), 825 (2000).
24. Д. Н. Оленников, И. Н. Зилфикаров и Т. А. Ибрагимов, *Химия растит. сырья*, № 3, 77 (2010).
25. L. Lucinia, M. Pellizzonia, R. Pellegrinob, et al., *Food Chemistry* **170**, 501 (2015).
26. Д. Н. Оленников, И. Н. Зилфикаров, Т. А. Ибрагимов и др., *Химия растительного сырья*, № 3, 83 (2010).
27. P. A. C. McPherson, A. Bole, K. A. Cruz, et al., *Chem. Phys. Lipids* **165**, 682 (2012).
28. I. Pinchuk and D. Lichtenberg, *Chem. Phys. Lipids* **178**, 632014 (2014).
29. E. T. Denisov and I. B. Afanas'ev, *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology* (Boca Raton: CRC Press. 2005).
30. A. Seyoum, K. Asres, and F. K. El-Fiky, *Phytochemistry* **67**, 2058 (2006).
31. H. Hu, X. Hu, and H. Qiu, *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7788 (2003).
32. D. Huang, B. Ou, M. Hampsch-Woodil, et al., *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4437 (2002).
33. S. Lee, S. G. Do, S. Y. Kim, et al., *J. Agric. Food Chem.* **60**, 11222 (2012).
34. Н. М. Эмануэль, Е. Т. Денисов и З. К. Майзус, *Ценные реакции окисления углеводов в жидкой фазе*, (Наука, М., 1965).
35. N. P. Palmina, E. L. Maltseva, V. I. Binjukov, et al., *Biophysics* **63** (1), 53 (2018).
36. A. R. Neves, C. Nunes, H. Amenitsch, and S. Reis, *Soft Matter* **12**, 2118 (2016).
37. S. Gall, L. Pinchuk, and D. Lichtenberg, *Chem. Phys. Lipids* **126**, 95 (2003).
38. E. A. Tehrani, C. J. F. Kahn, C. Baravian, et al., *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **95**, 75 (2012).

39. P. Strugała, S. Cyboran-Mikołajczyk, A. Dudra, et al.,
J. Membrane Biol. **249**, 393 (2016).

Kinetics of Initiated Oxidation of Phosphatidylcholine Liposomes with Introduced Aloe Extracts and Determination of Their Antioxidant Activity

N.N. Sazhina*, P.V. Lapshin**, and N.V. Zagoskina**

*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia

**Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya ul. 35, Moscow, 127276 Russia

Numerous species of the genus *Aloe* have attracted the attention of researchers because of different biological benefits and their capacity to act as antioxidants. This paper presents a comparative study of the kinetics of the inhibitory effect of ethanol extracts of five species of *Aloe* which was made using a model system of the oxidation of phosphatidylcholine liposomes. It was found that plant extracts of *A. marlothii* and *A. congolensis*, have higher antioxidant activity (by a factor of 13 and 10, respectively) than the best known *Aloe* species: *A. arborescens* and *A. vera*. The total phenolic content values of *A. marlothii* and *A. congolensis* are higher than those of *A. arborescens* and *A. vera* but in a lesser degree (by a factor of 5–6) than antioxidant activity was. This may indicate the presence of very active phenolic antioxidants in *A. Marlothii* and *A. congolensis*. Analysis of the influence of extracts introduced into liposomes on the liposome size showed that the most active extracts of *A. marlothii*, *A. congolensis* and *A. pillansii* reduce the average liposome size compared to pure liposomes, and extracts with weaker antioxidant activity increase it, what is probably due to changes in the lipid structure of liposomes by the components of extracts. Based on the results obtained, *A. marlothii*, *A. congolensis*, and *A. pillansii* are suitable for studying other types of their biological activity that might contribute to new drug development.

Keywords: *Aloe*, phenolic metabolites, kinetics, oxidation, liposomes, phosphatidylcholine