

УДК 544-16; 615,31

Взаимодействие глицирризиновой кислоты с продуктами окисления холестерина: новый взгляд на проблему атеросклероза

О. Ю. ГЛУЩЕНКО, Н. Э. ПОЛЯКОВ, Т. В. ЛЕШИНА

Институт химической кинетики и горения Сибирского отделения РАН,
ул. Институтская, 3, Новосибирск 630090 (Россия)

E-mail: polyakov@kinetics.nsc.ru

Аннотация

Исследована способность глицирризиновой кислоты к образованию комплексов с продуктами окисления холестерина. Изучено влияние комплексообразования на скорость окисления холестерина озоном. Показано, что комплексообразование с глицирризиновой кислотой может стать эффективным подходом к регулированию уровня холестерина внутри и снаружи клеточных мембран, а также для извлечения продуктов окисления холестерина.

Ключевые слова: окисление холестерина, озон, глицирризиновая кислота, атеросклероз, комплекс холестерина

ВВЕДЕНИЕ

Холестерин играет важнейшую роль во многих биохимических процессах в организме, в частности он обеспечивает стабильность клеточных мембран, необходим для выработки витамина D и различных стероидных гормонов. Холестерин поступает в организм из двух источников – с пищей и за счет эндогенного синтеза, – причем преимущественно (около 80 %) он синтезируется самим организмом. В то же время холестерин снискал себе дурную славу из-за причастности к образованию атеросклеротических бляшек. Считается, что повышенное содержание в крови холестерина и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП) – основной фактор риска атеросклероза. Однако связь повышенного уровня холестерина с атеросклерозом неоднозначна: с одной стороны, увеличение содержания холестерина в плазме крови считается бесспорным фактором риска атеросклероза; с другой, – атеросклероз часто развивается у людей с нормальным уровнем холестерина. В действительности высокий уровень холестерина – лишь один из многочисленных факторов риска атеросклероза. Наличие этих

факторов у людей с нормальным уровнем холестерина потенцирует негативное влияние свободного холестерина на стенки сосудов и способствует возникновению атеросклероза даже при более низких концентрациях холестерина в крови. Согласно результатам, полученным в работе [1], основной вред организму наносит не столько сам холестерин, сколько продукты его окисления.

Наличие двойной связи в молекуле холестерина определяет ее подверженность окислению различными активными формами кислорода, присутствующими в организме. Когда их образование превосходит возможности антиоксидантных систем организма, возникает окислительный стресс, который играет большую роль в патогенезе многих серьезных заболеваний, в частности атеросклероза. Атерогенное действие оксистеролов продемонстрировано как *in vitro*, так и *in vivo* [1]. Обнаружено, что атеросклеротические бляшки содержат не только холестерин, но также и серии оксистеролов [2]. Вклад окисленных форм холестерина и ЛПНП в патогенез атеросклероза очень значителен. Кроме того, взаимодействие продуктов окисления холестерина с β -амилоидом приводит к нарушению

белкового обмена. Так, болезнь Альцгеймера возникает при накоплении β -амилоидов в тканях мозга, а взаимодействие с ними оксистеролов приводит к их ускоренному накоплению и, как следствие, к ускоренному течению заболевания [3]. В свете этого важной проблемой становится разработка способов влияния на токсичность продуктов окисления холестерина.

В недавних исследованиях была идентифицирована еще одна активная форма кислорода в артериях человека, пораженных атеросклерозом, – озон [4]. Озон – очень сильный оксидант, часто используемый для дезинфекции, удаления запахов, очистки воды, загрязненного воздуха и продуктов питания. С тех пор, как было установлено, что первичными мишенями озона являются ненасыщенные липиды в клеточных мембранах и продуктах питания, химия реакций озона с липидами стала изучаться более детально [5]. Установлено, что озон вырабатывается в очаге воспаления находящимися там антителами и клетками иммунной системы [4]. Из всех активных форм кислорода только озон разрывает двойную связь холестерина с образованием 5,6-секостерола (**IIa**), а при окислении холестерина в метиловом спирте образуется соединение **IIб** (схема 1). Последующие эксперименты показали, что атеросклероти-

ческие ткани содержат продукты, образующиеся при окислении холестерина озонем [4]. Таким образом, окисляя холестерин, озон вносит лепту в образование атеросклеротических бляшек. Кроме того, продукты озонлиза токсичны для клеток крови, и потому воспаление может усугубляться [4].

В настоящее время регуляция уровня холестерина осуществляется медикаментозными методами путем ингибирования реакции синтеза холестерина. Альтернативным подходом может стать использование природных комплексантов, способных связываться с молекулами холестерина и продуктами его окисления и влиять на их свойства. На сегодняшний день известен только один пример успешной реализации такого подхода – это комплексы холестерина с циклодекстринами (ЦД) [6, 7]. Известно, что ЦД эффективно извлекают холестерин из мембран, но при этом, во-первых, нарушается структура мембран, а во-вторых, – возможна кристаллизация как самих ЦД, так и их комплексов с холестерином.

Взаимодействие холестерина с глицирризиновой кислотой (ГК), показано на схеме 2, может представлять интерес по ряду причин. Во-первых, ГК – природный комплексант, проявляющий широкий спектр биологической активности. Она образует соединения вклю-

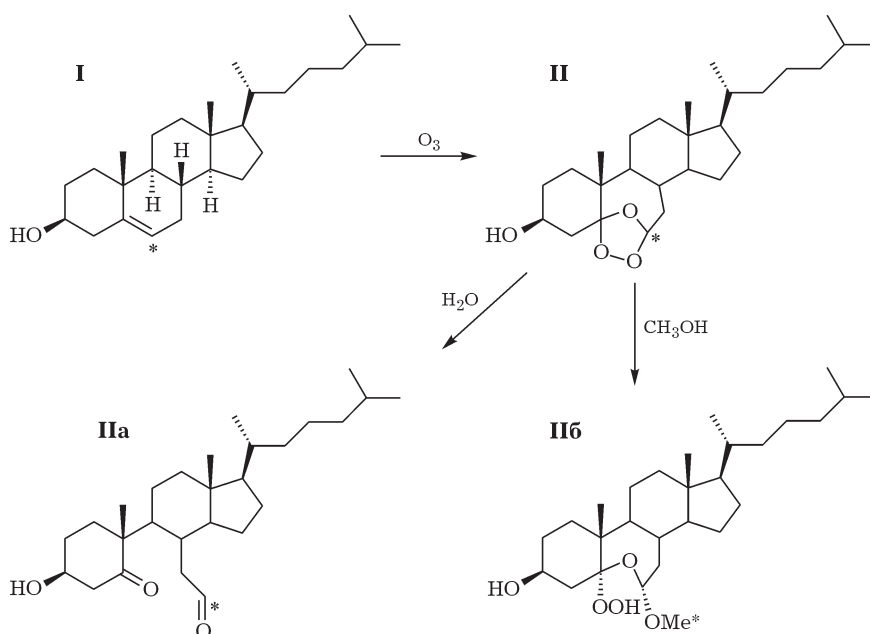


Схема 1.

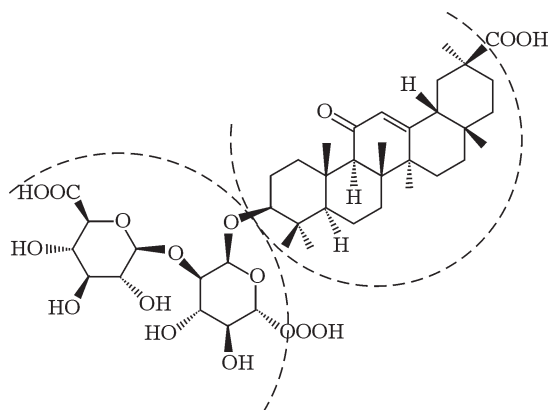


Схема 2.

чения со многими лекарственными препаратами и широко используется в медицине [8]. Во-вторых, в отличие от ЦД, отсутствуют данные о токсичности ГК. В-третьих, согласно некоторым данным, ГК воздействует на биосинтез и свойства холестерина [9]. В частности, известно, что ГК обладает свойствами антагониста кортизона, блокирует антигранулемное действие глюкокортикоидов, ингибируя при этом отложение гликогена в печени и биосинтез холестерина. Этот эффект наблюдается при совместном введении кортизона и ГК. В опытах на животных с атеросклерозом ГК и ее соли снижают содержание холестерина, ЛПНП и триглицеридов в крови и холестерина в тканях печени [9]. В-четвертых, имеются сведения о том, что применение ГК снижает уровень окисления холестерина [10]. Однако молекулярные механизмы этих эффектов в настоящий момент не изучены. Образование комплекса холестерина с ГК может пролить свет на эти факты и открыть новый путь борьбы с атеросклерозом.

Цель настоящей работы – исследование возможности комплексообразования продуктов окисления холестерина с ГК методом ЯМР-релаксации, а также исследование влияния ГК на процесс окисления холестерина озоном.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Озонирование холестерина производилось с помощью озонатора “Гроза” производительностью 300 мг O_3 /ч. Продукты озонлиза получены озонированием как сухих пленок, так и спиртового раствора холестерина. Ана-

лиз ЯМР-спектров продуктов и измерение времени релаксации T_2 протонов продуктов окисления и ГК осуществлялись на ЯМР-спектрометре Bruker DPX-200. Образование комплексов исследовалось с помощью метода ЯМР-релаксации. Известно, что времена релаксации протонов очень чувствительны к подвижности молекул [11]. При образовании комплексов подвижность молекул снижается, что приводит к значительному уменьшению времени релаксации протонов. В общем случае образование комплекса приводит к возникновению биэкспоненциальной или даже триэкспоненциальной кинетики релаксации, если в растворе имеется несколько разных типов агрегатов. Измерение предэкспоненциальных коэффициентов позволяет определить долю молекул, находящихся в комплексе, и на их основе рассчитать константы стабильности и стехиометрию комплекса. В общем виде для реакции $n\text{Chol} + m\text{GA} \leftrightarrow \text{Chol}_n\text{GA}_m$ константа стабильности записывается как $K = [\text{Chol}_n\text{GA}_m]/[\text{Chol}]^n[\text{GA}]^m$ где $[\text{Chol}]$ – концентрация свободного холестерина; $[\text{GA}]$ – концентрация свободной ГК. Значения m и n рассчитывались с помощью программы оптимизации из экспериментов при различных соотношениях $[\text{Chol}]_0/[\text{GA}]_0$. В результате показано, что комплекс включает одну молекулу холестерина и две молекулы ГК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что при озонировании холестерина в различных растворителях образуются различные продукты окисления [12]. Нами исследованы процессы комплексообразования трех продуктов озонлиза: озонида (**II**), возникающего при окислении сухих пленок; продукта (**IIб**), возникающего при окислении холестерина в метанольном растворе; секостерола (**IIа**), образующегося в обоих случаях (см. схему 1).

На рис. 1, а, б представлены кинетические кривые релаксации продукта **IIб** окисления холестерина в метаноле и озонида (**II**). Видно, что кривые имеют биэкспоненциальный характер, малое время релаксации (порядка 20 мс) соответствует связанному состоянию. Для секостерола, как при озонирова-

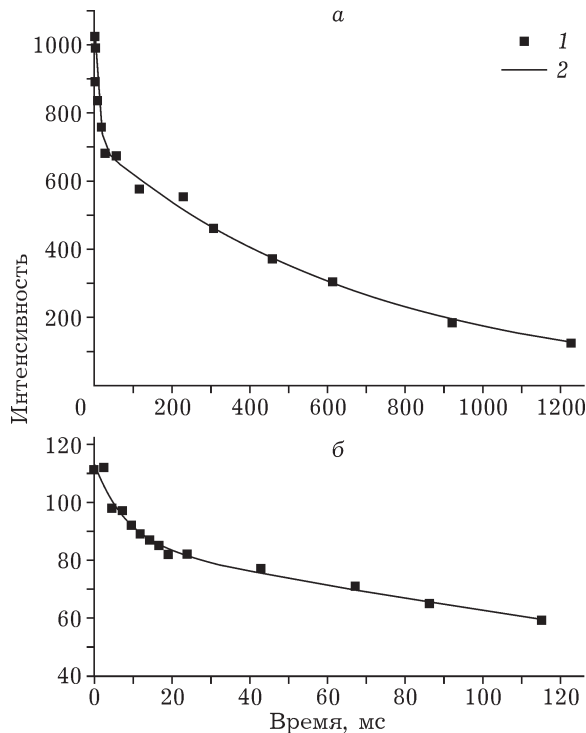


Рис. 1. Кинетика спада сигналов эха протонов продукта **II**6 озонирования **I** в метаноле (а) и озонида **II** (б): 1 – эксперимент, 2 – биэкспоненциальная аппроксимация.

нии сухих пленок, так и при окислении в метаноле, кинетика релаксации носит моноэкспоненциальный характер. Следовательно, какого-либо связывания этого продукта с ГК не происходит.

Для озонида рассчитаны константы стабильности при комнатной температуре и при 320 К в предположении стехиометрии 1 : 2, рассчитанной для комплекса холестерина. Рассчитанная константа стабильности для комплекса озонида с ГК составила $K_{12}(300\text{ K}) \approx 7 \cdot 10^7 (\pm 3 \cdot 10^7) \text{ M}^{-2}$. Определены термодинамические параметры комплексообразования: $\Delta H \approx (-28 \pm 14) \text{ кДж/моль}$, $\Delta G(300\text{ K}) \approx (-45 \pm 22) \text{ кДж/моль}$, $\Delta S(300\text{ K}) \approx (57 \pm 25) \text{ Дж/(моль} \cdot \text{K)}$.

Известно, что стабилизация комплекса самого холестерина с ГК происходит исключительно за счет энтропийного фактора. Наблюдаемое нами отрицательное изменение энтальпии указывает на то, что гидрофобное взаимодействие вносит дополнительный вклад в образование комплекса. Это проявляется и в более высокой константе стабильности комплекса.

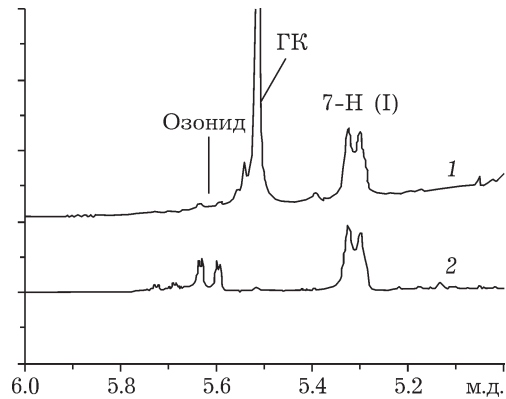


Рис. 2. Фрагменты спектров ЯМР ^1H продуктов озонирования сухих пленок чистого холестерина (1) и комплекса холестерина с ГК в CD_3OD (2). Продолжительность озонирования 60 мин.

Дополнительно нами исследовано влияние ГК на скорость окисления холестерина озонном. Для этого сравнивались интенсивности сигналов ЯМР продуктов озонирования сухих пленок чистого холестерина и комплекса холестерина с ГК (рис. 2). Установлено, что в комплексе с ГК выход продукта окисления уменьшился приблизительно в 4.5 раза. Мы полагаем, что этот эффект связан с антиоксидантными свойствами самой ГК. Ранее нами была обнаружена способность ГК захватывать свободные пероксидные радикалы в растворе [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе впервые обнаружено образование стабильных комплексов глицирризиновой кислоты с продуктами окисления холестерина. Это наблюдение представляет несомненный интерес, учитывая цитотоксичность этих продуктов и их предполагаемую роль в развитии атеросклероза. Предлагаемый подход может положить начало новому направлению борьбы с одним из самых распространенных заболеваний XXI века.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Leonarduzzi G., Sottero B., Galli G. // J. Nutr. Biochem. 2002. Vol. 13. P. 700–710.
- 2 Ostlund R., Racette S., Stenson W. // Nutr. Rev. 2002. Vol. 60. P. 349–359.

- 3 Usui K., Hulleman J. D., Paulsson J. F., Siegel S. J., Powers E. T., Kelly J. W. // *Proc. of the National Acad. of Sciences*. 2009. Vol. 106. P. 44.
- 4 Wentworth P., Nieva J., Takeuchi C., Galve R., Wentworth A., Dilley R., DeLaria G., Saven A., Babior B., Janda K., Eschenmoser A., Lerner R. // *Science*. 2003. Vol. 302. P. 1053–1057.
- 5 Pulfer M. K., Murphy R. C. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 26331–26338.
- 6 Alcalde M. A., Antelo A., Jover A., Meijide F., Tato J. V. // *J. Inclusion Phenomena Macrocyclic Chem.* 2009. Vol. 63. P. 309–317.
- 7 Kilsdonk E. P. C., Yancey P. G., Stoudt G. W., Bangerter F. W., Johnson W. J., Phillips M. C., Rothblat G. H. // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 17250–17256.
- 8 Fiore C., Eisenhut M., Krausse R., Ragazzi E., Pellati D., Armanint D., Bielenberg J. // *Phytotherapy Res.* 2008. Vol. 22. P. 141–148.
- 9 Толстикова Г. А., Балтина Л. А., Шульц Э. Э., Покровский А. Г. // *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23, № 9. С. 691–709.
- 10 Fuhrman B., Buch S., Vaya J., Belinky P., Coleman R., Hayek T., Aviram M. // *Am. J. Clinical Nutrition*. 1997. Vol. 66. P. 267–275.
- 11 Poole C. P., Farrah H. A. // *Relaxation in Magnetic Resonance*. NY: Acad. Press, 1971. P. 392.
- 12 Tagiri-Endo M., Nakagawa K., Sugawara T., Ono K., Miyazawa T. // *Lipids*. 2004. Vol. 39. P. 259–264.
- 13 Polyakov N. E., Leshina T. V., Salakhutdinov N. F., Kononova T. A., Kispert L. D. // *Free Rad. Biol. Med.* 2006. Vol. 40. P. 1804–1809.