

УДК 57.016.4

ВЛИЯНИЕ ФИТОЭКСТРАКТОВ НА КИНЕТИКУ ПРОДУКЦИИ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В КРОВИ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO

Лесовская М.И.

ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет»,
Красноярск, e-mail: lesmari@rambler.ru

Антиоксидантное влияние водных экстрактов подземных частей левзеи, подорожника, родиолы и ревеня на кинетику продукции активных форм кислорода фагоцитами крови человека *in vitro* зависело от температуры и длительности водной экстракции. Препараты корней ревеня и семян подорожника резко ингибировали продукцию биогенных АФК. Оптимальное снижение гиперпродукции АФК до уровня нормы наблюдалось под влиянием водных экстрактов левзеи и родиолы, полученных при короткой экспозиции (30 минут) и 60°C и под влиянием водных экстрактов корней и листьев подорожника, напротив, полученных при длительной (2 часа) экспозиции растительного сырья. У полисахаридной фракции (концентрации 0,1 и 0,01 %) не выявлено антиоксидантных свойств в отличие от тотального препарата. Судя по инвариантности показателя T_{max} , антиоксидантные эффекты исследованных фитоэкстрактов обусловлены прямым взаимодействием их действующих начал со свободными радикалами.

Ключевые слова: окислительный стресс, свободные радикалы, фитоэкстракты, фагоциты крови, хемилюминесценция

THE INFLUENCE OF PHYTOEXTRACTS ON THE KINETICS OF PRODUCTION OF FREE RADICALS IN HUMAN BLOOD IN VITRO

Lesovskaya M.I.

Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, e-mail: lesmari@rambler.ru

Antioxidant effect of water extracts of underground parts of *Rhaponticum carthamoides*, *Rhodiola rosea*, *Plantago major*, *Rheum tanguticum* were studied. It was found in vitro that the antioxidant effect of the extracts depends on the temperature and duration of the extraction procedure. The antioxidant effect of the extracts depends on the kind of plant as well as the temperature and duration of the extraction procedure with water. Extracts of the underground part of *Rheum* as well as *Plantago* seed extract strongly inhibited the production of biogenic free radicals. Optimal reduction of radicals overproduction to the normal level was observed under the influence of aqueous extracts of *Rhodiola* and *Rhaponticum* if they were received in a short time (30 minutes, 60°C) as well as under the influence of aqueous extracts of leaves and roots of plantain which were received in a long time (2 hours). It was found that the total plantago extract has antioxidant activity, whereas the polysaccharide fraction does not have. Based on invariance of T_{max} one can conclude that the antioxidant effects of the extracts which have been studied are due to the direct interaction of their active substances with free radicals.

Keywords: oxidative stress, free radicals, phytoextracts, blood phagocytes, chemiluminescence

Известно, что экстракты многих дикоросов и культурных растений обладают адаптогенным действием, однако подобные эффекты неустойчивы, трудно воспроизводимы, а нередко использование лекарственных растений связано с риском для здоровья [4]. Повышение эффективности использования фитоэкстрактов имеет высокую актуальность в связи с возрастанием интереса к сибирской флоре как богатому источнику новых лечебно-профилактических препаратов с перспективой импортозамещения, а также в связи с необходимостью физиологической (немедикаментозной) коррекции донологических нарушений гомеостаза, выявляемых по гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) фагоцитами [6]. Для этого необходима объективная информация об антиоксидантной активности фитопрепаратов, поскольку регулирование скорости цепных процессов внутренней среды орга-

низма и противодействие окислительному стрессу является ключевым условием поддержания здоровья.

Антиоксидантная активность традиционно связывается с химическим строением биологически активных компонентов растительного сырья. В то же время известно, что антиоксиданты обладают функциональной амбивалентностью, т.е. при определенных условиях приобретают способность не подавлять, а усиливать продукцию свободных радикалов [3]. Поэтому использование подобных фитоэкстрактов на фоне гиперпродукции АФК у людей, находящихся в состоянии предболезни, а тем более у людей с патологией, может способствовать не оздоровлению, а углублению нарушений гомеостаза.

Сведения об условиях антиоксидантно-прооксидантной инверсии в настоящее время малочисленны и противоречивы.

Недостаточно исследованы вопросы, связанные с физико-химическими условиями получения фитозэкстрактов. В то же время эти условия способны влиять на содержание и соотношение гидрофильных и гидрофобных фракций в суммарном фитозэкстракте, в конечном счёте определяя характер и интенсивность радикалотропного эффекта. Кроме того, для оценки суммарной антиоксидантной активности фитозэкстрактов необходимо использовать единые экспериментальные условия, моделирующие процессы свободнорадикальных процессов в биогенных условиях. Одним из адекватных способов является ингибиторный люминесцентный анализ в модели *in vitro*, где источником биогенных свободных радикалов являются фагоцитирующие клетки крови.

Целью работы было изучение *in vitro* радикал-направленных эффектов ряда фитозэкстрактов из образцов традиционной сибирской флоры в связи с физико-химическими условиями их получения для прогноза влияния *in vivo*.

Задачи работы включали оценку:

- 1) изменений параметров кинетики хемилюминесценции (S , T_{\max}) крови человека под влиянием водных экстрактов подземных и надземных частей растений;
- 2) влияния условий (длительности и температуры) водной экстракции на направленность и интенсивность радикал-направленной активности фитопрепаратов;
- 3) антиоксидантной активности тотального препарата подорожника и его полисахаридной фракции.

Материалы и методы исследования

В работе использовали 0,1 %-ные экстракты подземных частей (корневища и корни) двух сибирских дикоросов с известным адаптогенным эффектом (левея сафлоровидная *Rhaponticum carthamoides*; родиола розовая *Rhodiola rosea*), рудерального растения (подорожник большой *Plantago major*), а также 0,05 и 0,01 %-ные экстракты пищевой культуры (ревень тангутский *Rheum tanguticum*). У подорожника исследовали также 0,1 %-ные фитозэкстракты семян и листьев. Фитозэкстракты получали из высушенного измельчённого сырья методом водной экстракции при различной температуре (40, 50 и 60 °C) и длительности (30, 60, 90 и 120 мин) экспозиции. Рабочую концентрацию препаратов рассчитывали исходя из рекомендуемой терапевтической дозы перорального приёма [5] с учётом 50 %-ной биодоступности. Для ингибиторного анализа использовали метод люминол-зависимой латекс-стимулированной хемилюминесценции. Измерения проводили на РС-управляемом 36-канальном хемилуцинометре БХЛ-3604 (СКТБ «Наука» КНЦ СО РАН, Красноярск, Россия) на базе сектора иммунологии КНЦ СО РАН. В работе использовали образцы неразделённой периферической крови (из пальца), поскольку хемилюминесценция

крови определяется реактивностью фагоцитирующих нейтрофилов и ранее было показано, что ХЛ цельной крови и нейтрофильной массы достоверно не различаются [6]. Биологической моделью для тестирования радикалотропных свойств препаратов служила реакционная среда, содержащая микроколичества периферической крови, полученные от практически здоровых людей ($n = 20$) с гиперпродукцией АФК фагоцитами (превышение клинической нормы в 2 раза).

Реакционная смесь включала 100 мкл разбавленной периферической крови (1:10 в среде Хенкса, объем пробы от одного человека 50 мкл), 200 мкл люминола (*Sigma*) в концентрации $2,2 \cdot 10^{-4}$ М, 100 мкл латекса с концентрацией частиц $5 \cdot 10^8$ мл⁻¹ (ВНИИСК, Санкт-Петербург), опсонизированного белками сыровотки крови от десяти здоровых доноров. При проведении анализа к реакционной смеси добавляли 50 мкл тестируемого препарата или физраствора (контроль). Запись кинетики продолжали 90 минут. Кинетogramмы анализировали по параметрам светосуммы (S , млн имп.), высоте пика (I , имп./с) и времени его достижения (T_{\max} , мин). Референтная ХЛ-кинетogramма была получена ранее [8]. Все исследованные оригинальные фитозэкстракты имели максимумы поглощения при длинах волн ниже 350 нм, тогда как максимум световой эмиссии люминола соответствует $\lambda = 425$ нм. Таким образом, все полученное излучение было обеспечено люминолом, соответствовало содержанию свободнорадикальных метаболитов в среде и не искажалось присутствием препаратов.

Выводы о достоверности отличий полученных показателей кинетogramм от референтных параметров осуществляли на основании параметров вариационной статистики, оценка которых осуществлялась автоматически во время записи кинетики генерации АФК. Оценка межвыборочных различий осуществляли на основе параметрического t -критерия Стьюдента, гипотезу о соответствии нормальному распределению генеральной совокупности данных проверяли с использованием критерия Пирсона.

Результаты исследования и их обсуждение

Продукция АФК в крови практически здоровых людей с гиперактивными фагоцитами (контроль превышал клиническую норму в 2,1 раза) в различной степени снижалась под влиянием фитопрепаратов. Результаты представлены на диаграмме, где длина лепестка обозначает кратность превышения референтных показателей светосуммы (S) и времени достижения пика (T_{\max}) продукции АФК (рис. 1).

Из рис. 1 видно, что под влиянием 0,05 %-го экстракта ревеня (ревень-1) содержание АФК резко уменьшалось, в 7 раз относительно контроля до 30 % от уровня нормы. Добавление к реакционной смеси 0,01 %-го экстракта сопровождалось уменьшением светосуммы до уровня, сопоставимого с нормой: 0,9...1,3. Известно, что ревень содержит большое количество антрахинон-производных и танинов, что обеспечивает его мощный антирадикальный эффект [4]. В то же время *in vivo* избыточная

элиминация свободных радикалов, выполняющих важные метаболические функции, чревата вторичными нарушениями метаболизма. Поэтому для определения физиологических доз данного экстракта для пищевого и профилактического использования важно учитывать, что физиологичное воздействие ревеня на окислительный баланс внутренней среды организма может осуществляться в диапазоне как минимум на порядок ниже наиболее распространенной в фитотерапии 0,1%-ной концентрации. Более концентрированные препараты ревеня могут оказать угнетающее действие на баланс биогенных АФК.

10 и 30% соответственно). По-видимому, длительная экстракция способствует избыточному накоплению гидрофильных антиоксидантов, присутствующих в фитомассе левзеи (флавоноиды (включая дигидрокверцетин), гидроксिलированные фитостероиды – инокостерон, экидистерон и др., производные гидроксикоричной кислоты и др. [2]), что сдвигает баланс свободнорадикальных процессов в сторону прооксидации. Таким образом, можно полагать, что получение экстракта левзеи для адекватного снижения уровня биогенных АФК допустимо сокращать до 30 минут при температуре не ниже 60°C.

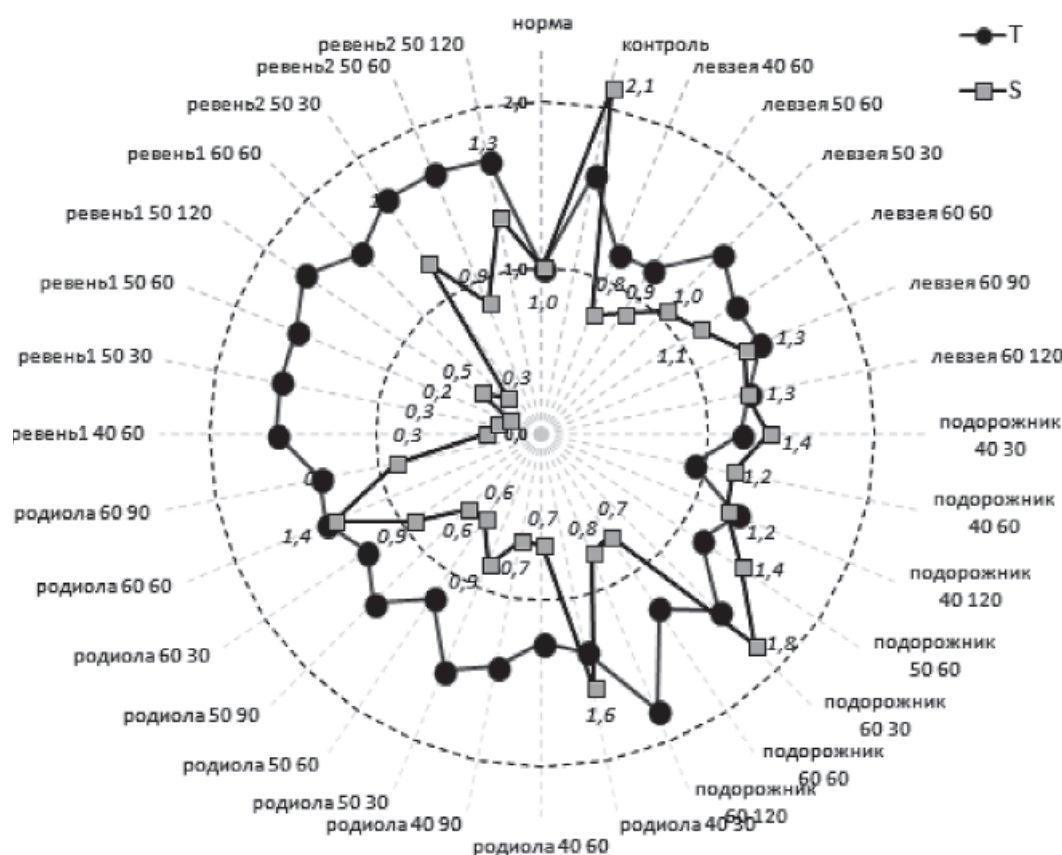


Рис. 1. Кратность превышения референтных параметров кинетики ХЛ крови практически здоровых людей под влиянием фитоэкстрактов (после названия растения первое число – температура экстракции, °С; второе – длительность, мин)

Под влиянием 0,1%-ных фитоэкстрактов левзеи, полученных в ходе 1-часовой экспозиции при 60°C, уровень АФК снижался до нормы. Сокращение времени до 30 минут не ухудшило результат, тогда как при увеличении экспозиции до 90 и 120 минут наблюдалась тенденция к ослаблению антиоксидантного эффекта (светосумма возросла относительно нормы на

У ризокстрактов подорожника, напротив, антиоксидантная активность обнаруживалась только при увеличении экспозиции и повышении температуры. Так, при температуре не выше 50°C и не более чем 1-часовой экстракции уровень светосуммы слабо изменялся под влиянием препарата, оставаясь в 1,3...1,8 раза выше нормы. Наряду с этим при 60°C и 120-минутной

экстракции был получен препарат, под влиянием которого светосумма снижалась в 2,9 раз, достигая 90% от референтного значения. Следовательно, получение ризоэкстрактов подорожника, обладающих эффективным антирадикальным действием, требует длительной (двухчасовой) экспозиции растительного сырья.

Антиоксидантное влияние препаратов родиолы на функциональную активность фагоцитов здоровых людей и пациентов зависело от продолжительности экстракции при всех рассмотренных температурных режимах. Количество АФК снижалось до уровня 40–60% от нормы под влиянием препарата, полученного при максимальной длительности экстракции (90 минут), тогда как под влиянием препаратов 30-минутной экспозиции уровень АФК достигал значений, сопоставимых с нормой (90–95%). Это согласуется с данными о термолабильности действующего начала родиолы розовой – салидрозида и других фенольных гликозидов [7]. Таким образом, для получения препарата, физиологично воздействующего на окислительный баланс внутренней среды организма, требуется кратковременная (не более 30 мин.) экспозиция сырья в воде.

2 ч, 60°C), наблюдалось снижение уровня АФК (рис. 2, контроль, кривая 2), до уровня, по светосумме достоверно не отличающегося от нормы (рис. 2, кривая 5).

В то же время в присутствии водных экстрактов семян подорожника наблюдалось ингибирование хемилюминесцентной реакции подобно экстракту ревеня (рис. 2, кривая 6). Считается, что иммунотропные свойства подорожника связаны с содержащимися в нем полисахаридами [4]. Результаты ингибиторного анализа антиоксидантных свойств полисахаридного комплекса подорожника и экстрактов из цельного растения показали, что у полисахаридной фракции в исследованном интервале концентраций (0,1 и 0,01%), в отличие от тотального препарата, антиоксидантных свойств не выявлено (рис. 2, кривые 3, 4).

Можно предположить, что в условиях использованной модели антиоксидантные эффекты большинства исследованных фитоэкстрактов были обусловлены не регуляторным влиянием, а прямым взаимодействием их действующих начал со свободными радикалами. Такой вывод следует из анализа результатов изменения показателя

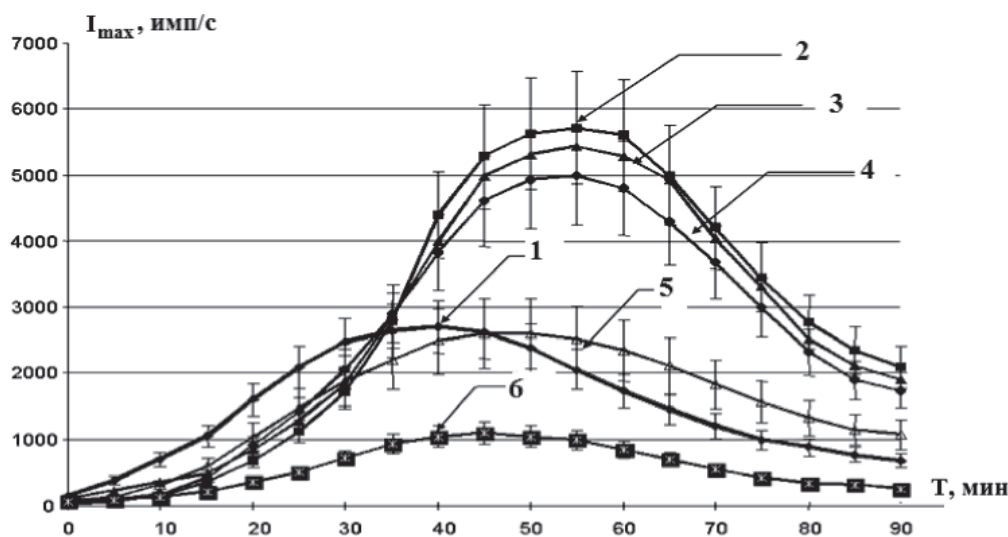


Рис. 2. Влияние экстрактов надземных частей *Plantago major* на кинетику Активированной ХЛ-реакции фагоцитов практически здоровых людей *in vitro*: 1 – норма; 2 – контроль; 3 – фракция полисахаридов (0,1%); 4 – фракция полисахаридов (0,01%); 5 – экстракт листьев (0,1%); 6 – экстракт семян (0,1%)

Экстракты различных надземных частей подорожника неоднозначно влияли на хемилюминесцентную реакцию. При добавлении в реакционную среду водной вытяжки из листьев, полученной при тех же условиях, что и ризоэкстракты (экспозиция

теля T_{max} , отражающего соотношение окислительно-проокислительных процессов продукции биогенных АФК фагоцитами крови. Время достижения максимума выработки радикальных метаболитов зависит от активации оксидантного комплекса, фиксирован-

ного в мембране фагоцитов. Поэтому отсутствие закономерных значимых изменений этого параметра под влиянием экстрактов ревеня, родиолы, левзеи и подорожника (рис. 1, 2) можно объяснить тем, что действующие начала в составе рассмотренных фитозэкстрактов по механизму антиоксидантного влияния относятся к скавенджерам, обрывающим цепи свободнорадикального окисления за счёт связывания и инактивации свободных радикалов различной химической природы [1]. Следует учитывать, что уровень продукции АФК фагоцитами крови практически здоровых людей, хотя и превышал абсолютную норму, тем не менее находился в пределах «физиологического коридора» [6]. Возможно, что в условиях экстремально высокого уровня АФК, сопровождающего ряд патологических состояний, влияние данных фитозэкстрактов не будет однозначным.

Выводы

Антиоксидантное влияние водных экстрактов левзеи, подорожника, родиолы и ревеня на кинетику продукции активных форм кислорода фагоцитами крови человека *in vitro* зависело от температуры и длительности водной экстракции. Препараты корней ревеня и семян подорожника резко ингибировали продукцию биогенных АФК. Оптимальное снижение гиперпродукции АФК до уровня нормы наблюдалось под влиянием водных экстрактов левзеи и родиолы, полученных при короткой экспозиции (30 минут) и 60°C, и под влиянием водных экстрактов корней и листьев подорожника, напротив, полученных при длительной (2 часа) экспозиции растительного сырья. У полисахаридной фракции (концентрации 0,1 и 0,01 %) не выявлено антиоксидантных свойств в отличие от тотального препарата. Судя по инвариантности показателя T_{max} , антиоксидантные эффекты исследованных фитозэкстрактов обусловлены прямым взаимодействием их действующих начал со свободными радикалами.

Список литературы

1. Денисов Е.Т. Радикальные реакции в химии, технологии и живом организме. Лекция 14. – Черноголовка, 2003. – С. 89–101.

2. Дремова Е.А. Фитохимическое исследование левзеи сафлоровидной (*Leuzea carthamoides* (Willd): Автореферат дисс.... кандидата фармацевтических наук: 15.00.02 / ГОУВПО «Самарский государственный медицинский университет», 24.05.27. – Самара, 2007. – 26 с.

3. Зиновьева В.Н., Спасов А.А. Антиоксидантные фитонутриенты: антиканцерогенные и антимуtagenные эффекты, их механизмы / Биоантиоксидант: тезисы докладов VIII Международной конференции. Москва, 04–06 октября 2010 г. – С. 170–171.

4. Трескунов К.А. Казуистика фитотерапии редких, тяжелых, смертельно опасных заболеваний. – Черноголовка, редакционно-издательский отдел ИПХФ РАН. – 2012. – 208 с.

5. Корсун В.Ф., Корсун Е.В. Фитотерапия. Традиции российского травничества. – М.: ЭКСМО, 2010. – 880 с.

6. Лесовская М.И. Адаптационный потенциал неспецифической резистентности здоровых людей при различных функциональных нагрузках и состояниях организма: монография. – Красноярск, РИО КГПУ, 2003. – 248 с.

7. Лесовская М.И., Спиридонова М.С., Мельчаков В.В. Химия микробионутриентов. Красноярск: РИО КГПУ, 2001. – 36 с.

8. Пухов К.И., Макарская Г.В., Яхнина Е.И., Пухова Я.И. Хемиллюминесцентный анализ кинетики генерации активных форм кислорода клетками цельной крови при взмещаеваемых эксфузиях крови // ДАН. – 1991. – Т. 316. – № 1.

References

1. Denisov E.T. / *Chernogolovka*, 2003. С. 89–101.
2. Dremova E.A. *Avtoferat diss.... kandidata farmaceuticheskikh nauk: 15.00.02 / GOUVPO SamarSKIY gosudarstvennyj medicinskiy universitet, 24.05.27. Samara, 2007. 26 p.*
3. Zinoveva V.N., Spasov A.A. / *Bioantioxidant: tezisy dokladov VIII Mezhdunarodnoy konferebicii. Moskva, 04–06 oktyanrya 2010. pp. 170–171.*
4. Treskunov K.A.. *Chernogolovka, RIO IPChF RAN. 2012. 208 p.*
5. Korsun V.F., Korsun E.V. M.: *EKSMO, 2010. 880 p.*
6. Lesovskaya M.I. *Krasnoyarsk: RIO KGPU, 2003, 248 p.*
7. Lesovskaya M.I., Spiridonova M.S., Melchakov V.V. *Krasnoyarsk: RIO KGPU, 2001. 36 p.*
8. Puchov K.I., Makarskaya G.V., Yachnina E.I., Puchova Ya.I. // *Doklady Akademii Nauk. 1991, v. 316. no. 1.*

Рецензенты:

Мучкина Е.Я., д.б.н., профессор кафедры экологии и природопользования ИЭУиП, ФГАОУ ВПО СФУ, г. Красноярск;
Тарасова О.В., д.с.-х.н., профессор, зав. отделением экологии, природопользования и географии ИЭУиП, ФГАОУ ВПО СФУ, г. Красноярск.

Работа поступила в редакцию 06.03.2015.