

Ю.И. Рагино, К.В. Свиридов, Е.В. Каштанова, Г.В. Флейшман

АНТИОКСИДАНТНЫЙ ЭФФЕКТ СЕМЯН *SALSOLA COLLINA*

ГУ НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск

В связи с актуальностью создания новых биологически активных добавок растительного происхождения целью исследования было оценить антиоксидантную активность компонентов семян солянки холмовой (*Salsola collina*) — распространенного в Сибири однолетнего растения — на модели  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированного окисления липопротеинов низкой плотности (ЛНП) *in vitro*. В спиртовом экстракте из семян *Salsola collina* флуориметрическим методом был детектирован  $\alpha$ -токоферол в концентрации  $2,85 \pm 0,34$  мг/мл экстракта из 100 мг гомогената семян. Спиртовой и водный экстракты из гомогената семян *Salsola collina* в конечных концентрациях от 0,1 до 5 мг/мл добавляли в инкубационную среду ЛНП и через 1 и 2 ч проведения окислительной модификации ЛНП в присутствии ионов  $\text{Cu}^{2+}$  регистрировали в них уровень продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Обнаружен отчетливый дозозависимый антиоксидантный эффект компонентов семян солянки холмовой. Более выражено и дозозависимо  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированное окисление ЛНП ингибировали липофильные соединения спиртового экстракта — при увеличении концентрации экстракта от 0,2 до 5 мг/мл в пробе происходило снижение уровней продуктов ПОЛ в ЛНП на 10–22% в сравнении с контролем. Менее выраженное ингибирование  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированного окисления ЛНП отмечено у гидрофильных соединений водного экстракта. Таким образом, на модели  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированного окисления ЛНП *in vitro* нами выявлен отчетливый дозозависимый антиоксидантный эффект семян *Salsola collina*.

**Ключевые слова:** семена солянки холмовой, антиоксидантный эффект,  $\alpha$ -токоферол,  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированное окисление, липопротеины низкой плотности

**Введение**

В последние десятилетия и в медицинской науке, и в практической медицине значительно вырос интерес к лекарственным препаратам и биологически активным добавкам растительного происхождения, содержащим природные биологически активные соединения. Они обладают рядом преимуществ, таких, как многосторонность и мягкость воздействия на организм, биосовместимость, отсутствие или незначительный побочный эффект, хорошая переносимость и др. В растениях содержатся полифенольные соединения (кверцетин, катехин и др.), являющиеся природными потенциальными антиоксидантами. Несмотря на весьма неоднозначные суждения относительно эффективности антиоксидантной терапии, появившиеся в последние годы, тем не менее и в мировой науке, и в медицинской практике чрезвычайно актуальным является поиск новых антиоксидантных соединений растительного происхождения.

Солянка холмовая (*Salsola collina*) представляет собой однолетнее растение, распространенное от низовья Волги до Дальнего Востока, в том числе в Сибири. Недавно был подробно определен и изучен состав травы *Salsola collina* [1, 4]. Биологически активный комплекс травы *Salsola collina*

содержит в своем составе флавоноиды, полисахариды, каротиноиды, стерины, сапонины, липиды, аминокислоты, микроэлементы. Предварительно было показано, что экстракт травы *Salsola collina* является ингибитором свободнорадикального окисления и препятствует образованию первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2]. В НИИ терапии СО РАМН начаты работы по изучению некоторых эффектов компонентов семян *Salsola collina* в доклинических экспериментальных исследованиях.

**Целью настоящей работы** было изучение возможного антиоксидантного эффекта компонентов семян *Salsola collina in vitro* на модели  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированного окисления липопротеинов низкой плотности (ЛНП).

**Материал и методы исследования**

Семена солянки холмовой, предварительно подвергнутые многоступенчатому измельчению и микронизации без участия балластных веществ и химических соединений, были гомогенизированы. Из гомогената семян *Salsola collina* (50 мг, 250 мг и 500 мг) проводили спиртовую и водную экстракцию. Спиртовую экстракцию (конечный объем этанола 5 мл) гидрофобных соединений из семян *Salsola collina* проводили в течение 72 ч при комнатной температуре. Водную экстракцию (ко-

нечный объем  $H_2O$  5 мл) гидрофильных соединений из семян *Salsola collina* проводили в течение 8 ч на водяной бане при 37 °С.

В спиртовом экстракте определяли концентрацию жирорастворимого антиоксиданта  $\alpha$ -токоферола флуориметрическим методом [8]. К 250 мкл экстракта добавляли 0,5 мл этилового спирта, встряхивали, добавляли 0,25 мл аскорбиновой кислоты и 0,5 мл КОН. После 40 минут водяной бани при температуре 70 °С пробы остужали, экстрагировали 2 мл гексана, тщательно встряхивая. Верхний гексановый слой анализировали на спектрофлуориметре «Hitachi F-300». Длина волны составляла  $\lambda_{ex}$  290,  $\lambda_{em}$  334 nm. Результаты выражали в мг/мл экстракта.

Для выделения ЛНП использовали сливную остаточную сыворотку крови пациентов, проходящих плановое биохимическое обследование в клинике НИИ терапии СО РАМН. Кратко: ЛНП получали из 0,5 мл сыворотки крови осаждением в присутствии гепарина (200 ЕД/мл сыворотки) и хлорида марганца (50 мМ/мл сыворотки), промывали 0,9% раствором хлорида натрия с 50 мМ раствором фосфатного буфера, pH 7,4, после чего осажденные ЛНП перерастворяли в 1 М растворе хлорида натрия. В выделенных ЛНП измеряли концентрацию белка по методу Лоури и исходный уровень продуктов ПОЛ [7]. Окислительную модификацию ЛНП проводили в среде Дульбекко без кальция и магния, содержащей 50 мкмоль  $CuSO_4$  в присутствии 0,2 мг/мл ЛНП [3]. Пробы инкубировали при 37 °С на водяной бане без добавления экстракта семян *Salsola collina* (контроль) и с его добавлением (опыт). Конечные концентрации экстракта семян *Salsola collina* в опытных пробах серий № 1 и № 2 были — 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 500 мкг/мл, 1-5 мг/мл. Через 1 ч и 2 ч инкубации оценивали степень окислительной модификации ЛНП мето-

дом определения продуктов ПОЛ [7]. Интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ регистрировали на спектрофлуориметре «Hitachi F-3000» при длине волны 553 nm (длина волны возбуждающего света 515 nm). Результаты выражали в нмоль МДА/мг ЛНП. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета статистических программ SPSS. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В спиртовом экстракте из семян *Salsola collina* был детектирован жирорастворимый антиоксидант  $\alpha$ -токоферол. Концентрация его в 1 мл экстракта из 100 мг семян *Salsola collina* составила в среднем  $2,85 \pm 0,34$  мг/мл.

Исходный уровень продуктов ПОЛ в выделенных ЛНП до проведения их окислительной модификации *in vitro* был  $6,39 \pm 0,45$  нмоль МДА/мг белка ЛНП. В контрольных пробах после 1 и 2 ч инкубации ЛНП в присутствии катализаторов окисления уровень продуктов ПОЛ в ЛНП составил  $15,9 \pm 1,7$  и  $30,2 \pm 2,5$  нмоль МДА/мг белка ЛНП соответственно. На рисунке 1 представлены результаты оценки влияния разных концентраций спиртового экстракта из семян *Salsola collina* на показатели  $Cu^{2+}$ -индуцированного окисления ЛНП. Добавление в среду инкубации ЛНП спиртового экстракта из семян *Salsola collina* уже в концентрации 0,2 мг/мл привело к снижению уровня продуктов ПОЛ в ЛНП после 1 ч их инкубации на 11%, после 2 ч — на 10% в сравнении с контролем. Повышение концентрации спиртового экстракта до 1 мг/мл и 5 мг/мл приводило к дальнейшему торможению процесса  $Cu^{2+}$ -индуцированного окисления ЛНП. Так, концентрация экстракта 1 мг/мл привела к снижению уровня продуктов ПОЛ в ЛНП после 1 и 2 ч их инкубации на 17% и 16% соответственно в сравнении с контролем. При концентрации экстракта 5 мг/

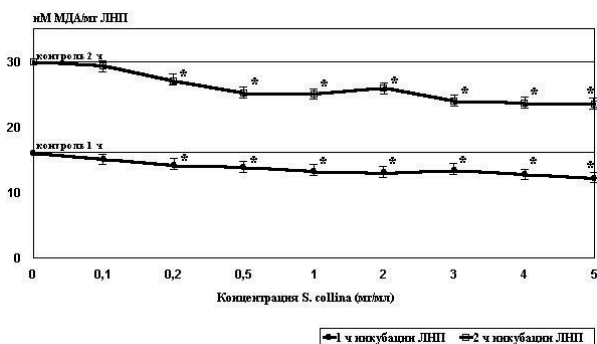


Рис. 1. Уровни продуктов перекисного окисления липидов в липопотеидах низкой плотности (ЛНП) после 1 и 2 ч их  $Cu^{2+}$ -индуцированного окисления *in vitro* в присутствии спиртового экстракта из семян *Salsola collina* разных концентраций.

Контроль — инкубация ЛНП без добавления экстракта;  
\* — различие в сравнении с контролем при  $p < 0,01$ .

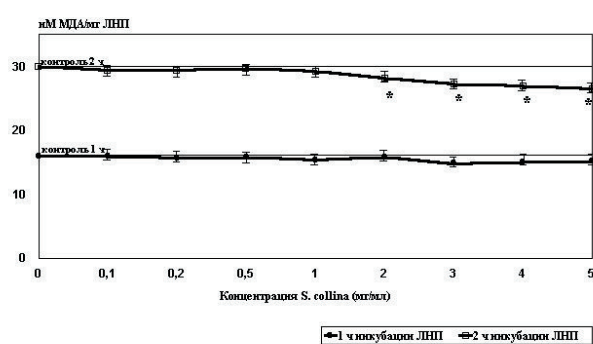


Рис. 2. Уровни продуктов перекисного окисления липидов в липопотеидах низкой плотности (ЛНП) после 1 и 2 ч их  $Cu^{2+}$ -индуцированного окисления *in vitro* в присутствии водного экстракта из семян *Salsola collina* разных концентраций.

Контроль — инкубация ЛНП без добавления экстракта;  
\* — различие в сравнении с контролем при  $p < 0,01$ .

мл пробы соответствующие показатели были — -24% и -22%.

Вторая серия экспериментов *in vitro* была посвящена исследованию антиоксидантной активности водного экстракта из семян *Salsola collina* (Рис. 2). Снижение показателей  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированного окисления ЛНП зарегистрировано нами при добавлении более высоких концентраций водного экстракта и только в точке после 2 ч инкубации ЛНП. Так, добавление в среду инкубации ЛНП водного экстракта из семян *Salsola collina* в концентрациях от 2 до 5 мг/мл приводило к снижению уровня продуктов ПОЛ в ЛНП на 6-11,5% в сравнении с контролем.

Таким образом, в настоящем исследовании на модели  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированного окисления ЛНП *in vitro* нами обнаружен отчетливый дозозависимый антиоксидантный эффект компонентов семян солянки холмовой. Более выражено и дозозависимо  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированное окисление ЛНП ингибировали липофильные соединения спиртового экстракта из семян, менее выражено — гидрофильные соединения водного экстракта. Вероятно, выявленный антиоксидантный эффект спиртового экстракта можно объяснить присутствием в нем липофильных антиоксидантов, в том числе и зарегистрированного нами  $\alpha$ -токоферола. С другой стороны, ингибирующий эффект на процессы ПОЛ может быть обусловлен наличием в семенах *Salsola collina* и других компонентов с антиоксидантной активностью, таких, как полифенольные соединения — флавоноиды. Последние широко представлены в стеблях, семенах, цветках растений и являются антиоксидантами комбинированного действия [5]. Флавоноиды способны, с одной стороны, ингибировать свободнорадикальные процессы, реагируя с гидроперекисями полиненасыщенных жирных кислот липидов с образованием стабильных нетоксичных молекулярных продуктов, и, с другой стороны — образовывать комплексы с катализаторами ПОЛ — ионами металлов с переменной валентностью, способствуя обрыву цепей перекисного окисления [1, 6].

### Заключение

На модели  $\text{Cu}^{2+}$ -индуцированного окисления липопротеинов низкой плотности *in vitro* нами выявлен отчетливый дозозависимый ингибирующий перекисное окисление липидов эффект компонентов семян *Salsola collina*, указывающий на их антиоксидантную активность.

### Antioxidative effect of *Salsola collina* sabadilla

Yu.I. Ragino, K.V. Sviridov, E.V. Kashtanova, G.V. Fleishman

The working out of the new biologic active plant addition to food is very actually. The aim of the study

was to evaluate the antioxidative activity of components of *Salsola collina* sabadilla on the model of  $\text{Cu}^{2+}$ -dependent low-density lipoprotein (LDL) oxidation *in vitro*. Alpha-tocopherol ( $2,85 \pm 0,34$  mg/ml of extract from 100 mg of sabadilla homogenate) was detected in spirituous extract from *Salsola collina* sabadilla by fluorimetric method. Spirituous and water extracts from *Salsola collina* sabadilla homogenate in the concentrations from 0,1 to 5 mg/ml were added to LDL incubation medium. The level of lipid peroxidation (LPO) products was registered in LDL after 1 and 2 h of their  $\text{Cu}^{2+}$ -dependent oxidation. Distinct dose-dependent antioxidative effect of components of *Salsola collina* sabadilla was founded. Liposoluble substances of spirituous extract inhibited the  $\text{Cu}^{2+}$ -dependent LDL oxidation more pronounced and dose-dependent: the increasing of extract concentration from 0,2 to 5 mg/ml result to decreasing of LPO products in LDL of 10-22% compared to the control. Water-soluble substances of water extract inhibited the  $\text{Cu}^{2+}$ -dependent LDL oxidation similarly but less pronounce. Thus, we were revealed the distinct dose-dependent antioxidative effect of components of *Salsola collina* sabadilla on the model of  $\text{Cu}^{2+}$ -dependent LDL oxidation *in vitro*.

### Литература:

1. Влияние способа экстрагирования на спектр аминокислот экстракта травы солянки холмовой / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко, Е.М. Дорошенко, Н.К. Лунык // Вестник фармации. — 2000. — № 3-4. — С. 25-29.
2. Лунык Н.К. Получение и исследование препаратов на основе травы солянки холмовой / Н.К. Лунык, И.В. Тихонова // Тезисы III Международного конгресса «Народная медицина в России: прошлое, настоящее, будущее». — 1997. — С. 78.
3. Рагино Ю.И. Простой метод исследования резистентности к окислению гепарин-осажденных  $\beta$ -липопротеинов сыворотки крови / Ю.И. Рагино, М.И. Душкин // Клиническая лабораторная диагностика. — 1998. — № 3. — С. 6-9.
4. Саратиков А.С. Гепатозащитные свойства солянки холмовой / А.С. Саратиков, А.И. Венгеровский, В.С. Чучалин // Химико-фармацевтический журнал. — 1990. — № 6. — С. 38-40.
5. Фенольные биоантиоксиданты / Н.К. Зенков, Н.В. Кандалинцева, В.З. Ланкин и др. — Новосибирск, 2003. — 328 с.
6. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase / W.S. Chang, Y.J. Lee, F.J. Lu, H.C. Chiang // Anticancer Res. — 1993. — Vol. 13. — P. 2165-2170.
7. Schuh J. Oxygen-mediated heterogeneity of apo-low density lipoprotein / Schuh J., Fairclough G.F., Haschemeyer R.H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1978. — Vol. 75. — P. 3173-3179.
8. Taylor S.L. Sensitive fluorometric method for tissue tocopherol analysis / S.L. Taylor, M.P. Lamden, A.L. Tapel // Lipids. — 1976. — Vol. 11. — P. 530-538.