Биолог. журн. Армении, 1-2 (59), 2007

УДК 576.8:615.33:664.83

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

А.Е. ЗАКАРЯН, Г.А. ПОГОСЯН, Н.А. ЗАКАРЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики, 0025

Исследованы антиоксидантные свойства ряда лекарственных растений. Подробно изучалась группа лекарственных растений, оказывающих на организм противовоспалительное, болеутоляющее действие. Эффективность лекарственных растений в качестве антиоксидантов исследовалась по влиянию их водных и этаноловых экстрактов на интенсивность хемилюминесценции и образование ТБК-реактивных продуктов в супернатанте гомогената мозга крупного рогатого скота. Эффективность лекарственных растений в качестве антиоксидантов убывала в ряду: зверобой > подорожник > шалфей > щавель > ромашка > каперс. Выявлена pH-зависимость антиоксидантной активности водных вытяжек лекарственных растений.

Ուսումնասիրվել են մի շարք դեղաբույսերի հակաօքսիդանտային հատկությունները: Մանրամասն ուսումնասիրվել են օրգանիզմի վրա հակաբորբոքային, ցավազրկող ազդեցություն ունեցող դեղաբույսերը: Դրանց հակաօքսիդանտային արդյունավետությունը ուսումնասիրվել է ըստ ջրային և էթանոլային հանուկների ունեցած ազդեցության խոշոր եղջերավոր անասունի ուղեղի հոմոգենատի քիմլյումինեսցենտման ինտենսիվության և ՓԲՁ-ակտիվ արգասիքների առաջացման վրա: Դեղաբույսերի որպես հակաօքսիդանտների արդյունավետությունը նվազում է սրտոտնկ > ջրախոտ > եղեսպակ > ավելուկ > երիցուկ > կապար շարքում: Բացահայտվել է դեղաբույսերի ջրային հանուկների հակաօքսիդային ակտիվության pH կախվածությունը:

Investigation of antioxidant properties of some plants was carried out. A group of plants exhibited antimicrobial and sedative activity was studied in detail. Efficiency of plants as antioxidants was tested by the influence of their water and ethanole extracts on the yield of spontaneous chemiluminescence and TBA-reactive substances of big horned cattle's brain homogenate. The antioxidant effect decreases in the following consequence: *Hypericum perforatum* > *Plantage major* > *Salvia officinalis* > *Rumex crispus* > *Matricaria recutita* > *Capperis spinosa*. It was shown pH-dependence of antioxidant properties of water-extracts of drug plants.

Лекарственные растения - перекисное окисление липидов - антиокислительная активность - хемилюминесценция

Большое количество экспериментальных и клинических данных, накопленных к настоящему времени, свидетельствует о том, что возникновение и развитие широкого круга заболеваний человека и животных сопровождаются активацией свободнорадикальных реакций (СРР) перекисного окисления липидов (ПОЛ) клеточных мембран и липопротеидов плазмы крови, что является одним из основных молекулярных механизмов патогенеза [11, 13]. Это обстоятельство является стимулом для поиска и клинического применения новых водо- и жирорастворимых ингибиторов ПОЛ [3, 10].

В настоящее время имеется большой опыт клинического использования природных и синтетических антиоксидантов (АО), особенно тех, которые получаются из природного сырья лекарственных растений [2, 6, 8, 14]. Терапевтический эффект веществ растительного происхождения в корне отличается от действия общепринятых медицинских средств. Они мало токсичны, легко усваиваются и обладают широким спектром биологической активности [7].

В связи с этим целью настоящего исследования являлось изучение способности экстрактов некоторых лекарственных растений (ЛР) тормозить ПОЛ биологических мембран.

Материал и методика. В экспериментах использовали аптечные препараты следующих лекарственных растений: шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.), зверобой обыкновенный (*Hypericum perforatum* L.), каперс колючий (*Capparis spinosa* L.), подорожник большой (*Plantago major* L.), щавель курчавый (*Rumex crispus* L.), ромашка ободранная (*Matricaria recutita*). Изучали антиоксидантное действие водного и этанолового настоев вегетативных органов (корни, листья) и семян растений.

Приготовление настоев. Части растения – корни, листья, семена измельчали в фарфоровой ступке до получения однородной массы и взвешивали. Для приготовления настойки брали одну весовую часть сухого вещества растения на 10 объемных частей 70%-ного этилового спирта [7]. Горячие водные настои готовили, заливая навески проб десятичным объемом кипятка (95°). Настаивали в течение 1 часа. По окончании вышеуказанной процедуры отбирали пробы для изучения антиоксидантной активности (АОА).

АОА препаратов тестировали по измерению скоростей ПОЛ общей мембранной фракции мозга крупного рогатого скота. Гомогенат из ткани мозга готовили в день эксперимента: на 50 мМ Трис-HCl, 105 мМ KCl pH 7,4 буфере из расчета 1:10 (сырой вес ткани/объем буфера). Все процедуры проводили на льду. Промытую 0,85%-ным раствором NaCl ткань измельчали ножницами. Полученную массу гомогенизировали в вышеприведенном буфере в стеклянном гомогенизаторе Поттера-Элвехейма с тефлоновым пестиком. Полученный гомогенат центрифугировали при 4000 об/мин 15 мин. Содержащий липиды, плазматические мембраны, микросомы и митохондрии супернатант (1,5-2 мг/мл белка) использовали в качестве общей мембранной фракции мозга.

Процесс СР окисления мембранных липидов проводили двумя способами. В первом случае за протеканием ПОЛ наблюдали, регистрируя сопровождающую этот процесс хемилюминесценцию (ХЛ). Спонтанную ХЛ измеряли на высокочувствительной квантометрической установке, собранной на основе фотоэлектронного умножителя – ФЭУ-140 (диапазон спектральной чувствительности 200-650 нм) [10], регистрируя усиленный ток ФЭУ на самописце КСП-4, а также число импульсов ХЛ за 10 сек на цифровом осциллографе. В термостатируемую камеру перед ФЭУ помещали 3 мл супернатанта гомогената. Все измерения проводили при t=37°. Для изучения влияния экстрактов ЛР к супернатанту добавляли необходимое количество водного или этанолового настоя, в контроле – соответствующий объем дистиллированной воды или 70%-ный этанол. Темновой фон установки составлял 250 имп/10 сек.

Во втором случае окисление мембранных липидов запускали с помощью системы Fe^{2+} – аскорбат [4]. К суспензии мембран (5 мл/мл белка) в 50 мМ Трис-HCl, 105 мМ KCl pH 7,4 буфере добавляли 5 мкМ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и аскорбат (150 мкМ). После введения системы инициации и необходимого настоя ЛР мембраны инкубировали в течение 30 мин при температуре 37° и постоянном встряхивании. Об интенсивности процесса ПОЛ судили по накоплению продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой [11], выражая в виде эквивалентного количества малонового диальдегида (МДА), используя молярный коэффициент экстинкции $\varepsilon = 1{,}56 \cdot 10^5 M^{-1}cm^{-1}$.

АОА выражали в процентах ингибирования ПОЛ, определяя ее по формуле:

$$АОА = \frac{C_к - C_э}{C_к} \cdot 100$$

где $C_к$ – интенсивность ХЛ или количество МДА (нмоль/мг белка) гомогената мозга – контроля, $C_э$- интенсивность ХЛ или количество МДА (нмоль/мг белка) гомогената мозга с исследуемым экстрактом ЛР. Белок определили по Лоури [12]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение. Антиоксидантные свойства экстрактов ЛР изучали по ингибированию интенсивности спонтанной ХЛ мембранной фракции мозга как водными, так и этаноловыми настойками ЛР. Это давало возможность экстрагировать водорастворимые (гидрофильные) и гидрофобные соединения из растений. В табл. 1 представлена сравнительная характеристика АОА настоев вегетативных частей растений. Согласно полученным данным, определенную АОА проявляют настои всех исследованных ЛР. Однако этаноловые вытяжки обладают большей АОА, чем водные настои.

Таблица 1. **Антиоксидантные свойства настоев группы лекарственных растений при pH 7,4, (M±m)**

Лекарственное растение	Водная экстракция		Этаноловая экстракция	
	ХЛ, имп/10 сек	АОА, %	ХЛ, имп/10 сек	АОА, %
Гомогенат мозга	350±30	0	350±30	0
Шалфей, листья (*Salvia officinalis L.*)	232±22	34±2,8	220±14	37±3,2
Зверобой, цветки (*Hypericum perforatum*)	210±18	40±3,7	180±11	46±3,6
Каперс колючий, листья (*Capparis spinosa*)	375±40	-	324±25	7±0,5
Подорожник, листья (*Plantago major* L.)	225±21	36±3,4	190±12	48±3,8
Щавель курчавый, корень (*Rumex crispus* L.)	294±26	16±1,4	260±16	24±2,1
Ромашка, цветки (*Matricaria recutita* L.)	305±28	13±1,1	290±18	17±1,6

Так, если АОА водных настоев зверобоя, подорожника и шалфея составляла 40±3,7%, 36±3,4% и 34±2,8% соответственно, то для этаноловых настоев она возрастала до значений 46±3,6%, 48±3,8% и 37±3,2%. Подобный результат, вероятно, можно объяснить тем, что в спиртовой настойке содержатся гидрофобные соединения – флавоноиды: нафтодиантроновый краситель гиперицин в зверобое, фурокумарины в шалфее и щавеле [1], которые сравнительно легко проникают и взаимодействуют со структурированным участком липидного бислоя – с ненасыщенными жирнокислотными остатками - основным субстратом ПОЛ.

Эффективность в качестве антиоксидантов убывала в ряду: зверобой > подорожник >шалфей > щавель > ромашка > каперс. Следует ожидать, что выраженное протекторное действие на организм при липидной пероксидации окажут зверобой, подорожник, шалфей (рис. 1).

Результаты определения антиоксидантного действия настоев ЛР другим методом – по влиянию на образование одного из конечных продуктов ПОЛ-МДА представлены в табл. 2.

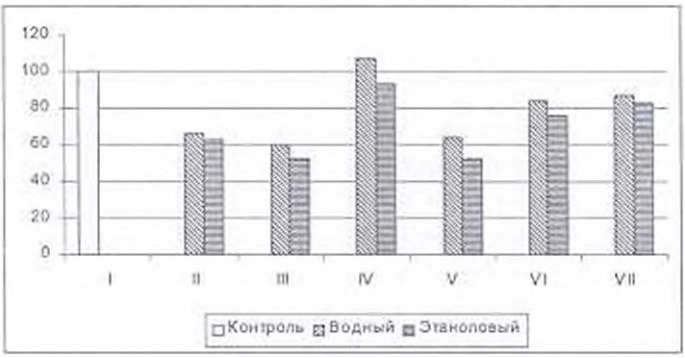


Рис. 1. Влияние водных и этаноловых вытяжек ЛР (% от контроля) на интенсивность спонтанной ХЛ гомогената мозга (контроль – 100%). I контроль – гомогенат мозга, II – шалфей, III – зверобой, IV – каперс, V – подорожник, VI – щавель, VII – ромашка.

Достоверной разницы ($p>0,5$) в значениях АОА спиртовых и водных экстрактов не наблюдается. В данной системе наибольший антиоксидантный эффект проявляли зверобой, подорожник и шалфей, наименее действующими антиоксидантами оказались щавель курчавый, ромашка и каперс колючий (табл. 2.).

Таблица 2. **Сравнительная эффективность вытяжек группы ЛР в качестве антиоксидантов, (M±m)**

Лекарственное растение	Водная экстракция		Этаноловая экстракция	
	МДА, нмоль/мг белка	АОА, %	МДА, нмоль/мг белка	АОА, %
Гомогенат мозга	624±58	0	624±58	0
Шалфей, листья (*Salvia officinalis* L.)	362±34	42±3,6	387±36	38±3,1
Зверобой, цветки (*Hypericum perforatum*)	331±32	47±4,3	337±33	46±4,4
Каперс колючий, листья (*Capparis spinosa*)	587±51	6±0,4	555±48	11±0,9
Подорожник, листья (*Plantago major* L.)	334±34	45±4,1	400±37	36±2,8
Щавель курчавый, корень (*Rumex crispus* L.)	500±43	20±1,8	487±42	22±1,7
Ромашка, цветки (*Matricaria recutita* L.)	537±44	14±1,2	524±43	16±1,4

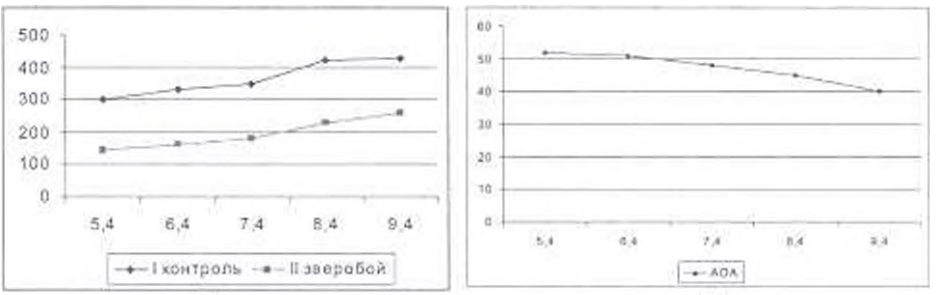
Известно, что скорость многих реакций с участием гидроперекисей липидов зависит от pH среды [9].

Для того чтобы выяснить, как зависит накопление продуктов ПОЛ от pH среды, мы исследовали зависимость интенсивности спонтанной ХЛ от pH среды гомогенизации ткани мозга в пределах pH 5,4 до pH 9,4.

Предварительно было установлено, что интенсивность спонтанного свечения гомогената вырастала от величины 300 имп/10 с при pH 5,4 до 425 имп/10 с при pH 9,4. На рис. 2 представлена зависимость интенсивности

спонтанной ХЛ гомогената и эффективность воздействия водной вытяжки наиболее действенного АО – зверобоя - от pH среды.

Из данных, приведенных на рис. 2, видно, что если при увеличении pH среды значение интенсивности спонтанной ХЛ возрастает, то эффективность воздействия или АОА настойки убывает, составляя 52% при pH 5,4 и 40% при pH 9,4. Следовательно, при водной экстракции биологически активных веществ из ЛР необходимо иметь в виду pH-зависимость при проявлении их антиоксидантной активности.



А Б

Рис. 2. Зависимость интенсивности спонтанной ХЛ гомогената мозга (кр. I, А), водной вытяжки зверобоя (кр. II, А) и АОА (%) той же вытяжки (Б) от pH среды.

Таким образом, из полученных данных следует, что водные и спиртовые экстракты группы изучаемых ЛР обладают различной степенью АОА. Применяясь как противовоспалительные, антимикробные, болеутоляющие средства, они могут воздействовать и как антиоксиданты, ингибируя процесс ПОЛ, патогенетическое значение которого установлено при многих заболеваниях. Следует подчеркнуть, что все рассмотренные экстракты могут найти применение при антиоксидантной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Большакова И.В., Лозовская Е.Л., Сапежинский И.И.* Биофизика, *42*, вып. 926-931, 1997.
2. *Большакова И.В., Лозовская Е.Л., Сапежинский И.И.* Биофизика, *43*, 2, 186-188, 1998.
3. *Васильева О.В., Любицкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А.* Биол. мембраны, *17*, 1, 42-49, 2000.
4. *Владимирова Ю.А., Арчаков А.И.* Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М.: Наука, 252 с., 1972.
5. *Закарян А.Е., Сукиасян А.Р.* Биолог. журн. Армении, *54*, 1-2, 38-42, 2002.
6. *Закарян А.Е., Пагикян А.Р., Погосян Г.А.* Биолог. журн. Армении, *43*, 1, 51-54, 1990.
7. *Зимин В.И.* Библиотечка лекарственных растений. 400 лекарственных растений, С.-Петербург. АО «Дорвиль», *1*, 232 с., 1993.
8. *Коновалова Г.Г., Тихзе А.К., Ланкин В.З.* Бюлл. эксп. биол. и мед., *130*, 7, 56-58, 2000.
9. *Панасенко О.М., Арнхольд Ю., Серженко В.И.* Биофизика, *43*, вып. 3, 463-469, 1998.

10. *Теселкин Ю.О., Жамбалова Б.А., Бабенкова И.В., Клебанов Г.И.* Биофизика, *41*, вып. 3., 620-623, 1996.
11. *Halliwell B., Gutteridge J.M.C.* Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford: University Press, p. 783, 1999.
12. *Lowny O.H., Rosebrough N.G., Farr A.L., Randall R.J.* J. Biol. Chem. *193*, 265-275, 1951.
13. *Vladimirov Y.A.* Free radical lipid peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation and biological consequences, in Free Radicals. Aging and Degenerative Diseases, Allan R. Liss, Inc. 141-195, 1986.
14. *Yildir A., Mavi A., Kare A.* J. Agric. Food Chem., *49*, 8, 4083-4089, 2001.

Поступила 14.III.2007