

УДК 57.085.23

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭКСТРАКТОВ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ (*ABIES SIBIRICA*), ПОЛУЧЕННЫХ МЕТОДОМ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ CO₂-ЭКСТРАКЦИИ

Е.Г. Шаповалова, А.Д. Бояринцева, А.А. Шейченко, М.О. Шкробова, А.М. Захаркива
Томский государственный университет, Томск, Россия

Аннотация. Данная статья посвящена изучению биологических эффектов компонентов растительного сырья. Объектами исследования являются хвойные экстракты пихты сибирской (*Abies Sibirica*), выделенные из ее древесной зелени и хвои методом сверхкритической флюидной CO₂-экстракции. Проведены исследования антирадикальной активности посредством свободного радикала DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил), влияния образцов на секрецию провоспалительных цитокинов методом иммуноферментного анализа по параметрам TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, жизнеспособности мононуклеарных клеток с помощью резазурин-теста.

Ключевые слова: антирадикальная активность, жизнеспособность макрофагов, секреция провоспалительных цитокинов, *Abies Sibirica*.

STUDY OF BIOLOGICAL POTENTIAL OF SIBERIAN FIR EXTRACTS (*ABIES SIBIRICA*) OBTAINED BY SUPERCRITICAL FLUID CO₂ EXTRACTION

E.G. Shapovalova, A.D. Boyarintseva, A.A. Sheichenko, M.O. Shkrobova, A.M. Zakharkiva
Tomsk State University, Tomsk, Russia

Abstract. This article is devoted to the study of biological effects of plant components. The objects of the study are coniferous extracts of Siberian fir (*Abies Sibirica*), isolated from its wood greenery and needles by the method of supercritical fluid CO₂ extraction. The studies of antiradical activity by means of the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-pyrcrylhydrazyl), the effect of samples on the secretion of proinflammatory cytokines by the method of enzyme immunoassay for the parameters TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, the viability of mononuclear cells using the resazurin test were carried out.

Keywords: antiradical activity, macrophage viability, secretion of proinflammatory cytokines, *Abies Sibirica*.

Введение

Лекарственное растительное сырье как источник разнообразных биологически активных веществ широко известно и практически применимо как в народной, так и современной медицине. Интерес к разработкам новых препаратов на основе природного сырья растет с каждым днем, поскольку они имеют значительный потенциал биологического влияния на организм, в том числе устраняют или минимизируют негативные последствия процессов окисления, включая свободно-радикальное, снижают риски развития патологических процессов и угнетения организма и клеточных структур. Особое внимание уделяется хвойным породам, богатым фенольными и терпеновыми соединениями, жирными кислотами, эфирными маслами и витаминами, что обуславливает значительные фармакотерапевтические эффекты на организм.

Пихта сибирская (*Abies Sibirica*) – уникальный источник ценных природных соединений, среди которых особое значение имеют эфирные масла и тритерпеновые кислоты. Так, пихтовая лапка (охвоенные концы ветвей) содержит до 2,5% эфирного масла, состоящего из борнилацетата, борнеола, камфена, пинена и др. [1]. Экстракт из пихтовой лапки проявляет общеукрепляющее действие, нормализует показатели артериального давления, применяется при лечении заболеваний нервной системы, аллергиях, анемии, обладает бактерицидными свойствами. На сегодняшний день уже имеются сведения о влиянии тритерпеновых кислот на

организм. Установлено, что они обладают антиоксидантным действием, которое обусловлено их способностью косвенно влиять на антирадикальную защиту [2]. В работе Ovesna [4] рассмотрен их цитотоксический эффект на раковые клетки. В исследованиях Fulda, Kroemer [3] отмечено их негативное воздействие на фибробласты, меланоциты, кератиноциты, нейронные клетки, лимфоциты. Работы Saaby, Nielsen [6] свидетельствуют о способности тритерпеновых кислот ингибировать продукцию цитокинов TNF- α и IL-6. Однако во всех вышеперечисленных исследованиях были изучены биологические эффекты только тритерпеновых кислот. В то время как совокупное их воздействие с соединениями других классов биологически активных веществ не описано в литературе, как и влияние тритерпеновых кислот на выработку цитокинов IL-1 β и IL-10.

Целью данной работы стало исследование антирадикальной активности образцов хвойных экстрактов пихты сибирской, их влияние на секрецию провоспалительных цитокинов и жизнеспособность мононуклеарных клеток. Это позволит углубить знания, способствуя разработке новых более эффективных и безопасных лекарственных препаратов на основе сырья хвойных пород и развитию фармакоиммунологии.

Экспериментальная часть

Исследуемые образцы представляют собой хвойные экстракты пихты сибирской (*Abies Sibirica*), выделенные из ее древесной зелени и хвои методом сверхкритической флюидной CO₂-экстракции. В своем химическом составе образцы содержат как дитерпеновые и тритерпеновые кислоты, так и смоляные, легкие карбоновые кислоты, мыла, хлорофиллы, калиевые соли жирных кислот. Некоторые характеристики образцов, включая концентрации основных БАВ, приведены ниже в табл. 1.

Таблица 1

Характеристики исследуемых образцов пихты сибирской					
№ п/п	1	2	3	4	5
Влажность, %	73,20	33,50	48,30	77,20	29,50
Сухой остаток, %	26,80	66,50	51,70	22,80	71,50
pH	9,90	9,50	8,12	8,28	8,92
Содержание ТТК, %	44	12	67	< 1	64

Образцы 1 и 2 получали в разные временные периоды по технологии очистки целевых компонентов. Образцы 3 и 4 были получены из шрота по укороченной технологии очистки целевых компонентов. Образец 5 был изготовлен по технологии аналогичной образцам 1 и 2 путем выделения БАВ из масляно-эфирного комплекса углекислотной экстракции. Для исследований была приготовлена серия растворов образцов с концентрациями 800, 400, 200 и 100 мкг/мл путем последовательного разбавления.

Метод определения антирадикальной активности основан на восстановлении антиоксидантами свободного радикала 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ). Спектрофотометрически измеряли значение оптической плотности в процессе взаимодействия ДФПГ-радикала и антиоксидантов и наблюдали обесцвечивание пурпурно-синей окраски радикала. Анализ образцов проводили на приборе СФ-2000 в кювете толщиной слоя жидкости 10 мм при длине волны 517 нм. В качестве стандарта-антиоксиданта использовали аскорбиновую кислоту.

Для оценки жизнеспособности клеток моноциты выделяли из лейкоцитомасляного слоя человека методом двойной магнитной сепарации [5]. В качестве контроля применяли клетки, посеянные на пластике. Клетки инкубировали при температуре 37°C и 7,5% CO₂ в течение 6 дней. Оценку жизнеспособности осуществляли посредством резазурина-теста. Флуоресценцию измеряли на микрофлуориметре Tecan Infinite 200 Pro при длинах волн 590 нм и 560 нм.

Оценку влияния образцов на секрецию провоспалительных цитокинов первичными макрофагами человека проводили методом иммуноферментного анализа по следующим параметрам: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 (Вектор-БЕСТ, Россия). Оптическую плотность растворов измеряли на микропланшетном фотометре Tecan Infinite F50 при основной длине волны 450 нм и длине волны сравнения 620 нм.

Обсуждение результатов

В результате исследования антирадикальной активности экстрактов пихты сибирской были получены следующие данные, приведенные в табл. 2 и на рис. 1.

Таблица 2

Антирадикальная активность исследуемых образцов и стандарта-антиоксиданта

С, мкг/мл	Антирадикальная активность, %					
	№ п/п					Аскорбиновая кислота
	1	2	3	4	5	
800	54,866	57,254	60,120	42,508	60,478	97,672
400	57,672	58,269	60,478	47,881	58,986	98,090
200	57,732	56,418	56,956	47,344	54,568	97,075
100	54,747	54,030	47,344	49,911	47,045	92,776

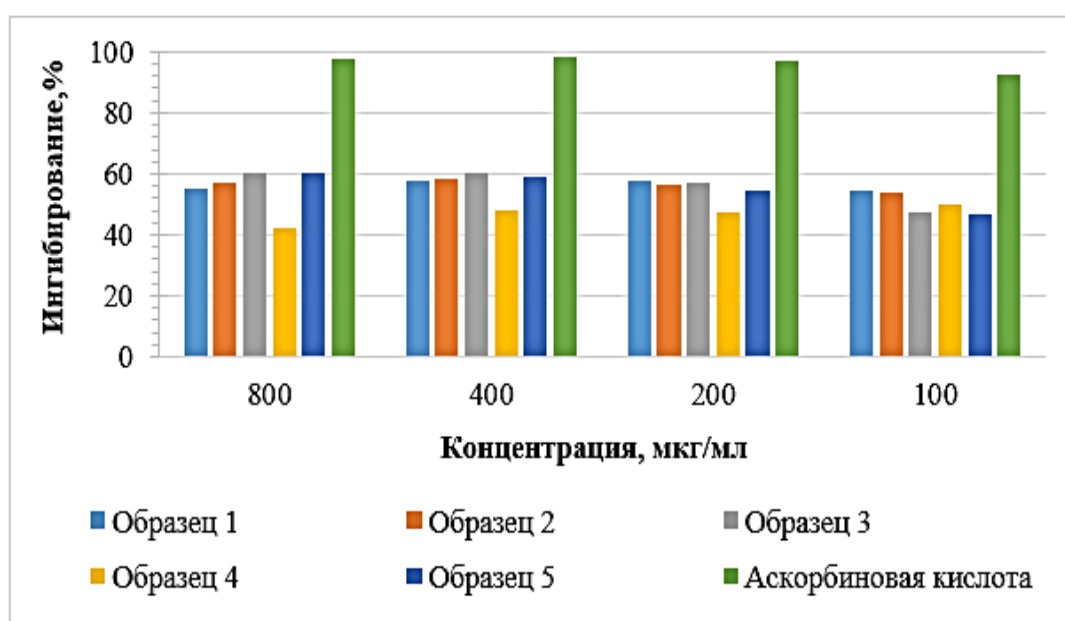


Рис. 1. Гистограмма антирадикальной активности образцов

Результаты демонстрируют тенденцию к возрастанию антирадикальной активности при увеличении концентрации образцов в растворе в среднем с 47,0% до 60,5%. Наибольшие значения показателя антирадикальной активности наблюдаются у образца 5 (60,5%) концентрацией 800 мкг/мл и образца 3 (60,5% и 60,1%) концентрацией 400 и 800 мкг/мл соответственно, наименьшие – образца 3 (47,3 %) концентрацией 100 мкг/мл, образца 4 (47,3 %) концентрацией 200 мкг/мл и образца 5 (47,0 %) концентрацией 100 мкг/мл. Высокие показатели образцов 3 и 5 при концентрации 800 мкг/мл предположительно связаны с относительно высоким содержанием тритерпеновых кислот (67% и 65% соответственно), согласно табл. 1, проявляющих антиоксидантные и антирадикальные свойства. Исследование жизнеспособности мононуклеарных клеток показало, что исследуемые образцы преимущественно подавляют жизнеспособность клеток иммунной системы через 6 дней их культивации (рис. 2).

Образец 4 обладает наименее выраженным негативным эффектом, показатель жизнеспособности по сравнению с положительным контролем составляет 78,75; 46,53 и 94,81% соответственно. У донора 3 образцы 1 и 2 имеют показатели жизнеспособности, превышающие 100%, что может быть обусловлено индивидуальной реакцией организма. Сопоставляя полученные результаты и содержание в образцах тритерпеновых кислот (табл. 1), можно предположить, что высокие концентрации тритерпеновых кислот обуславливают негативный эффект на жизнеспособность клеток.

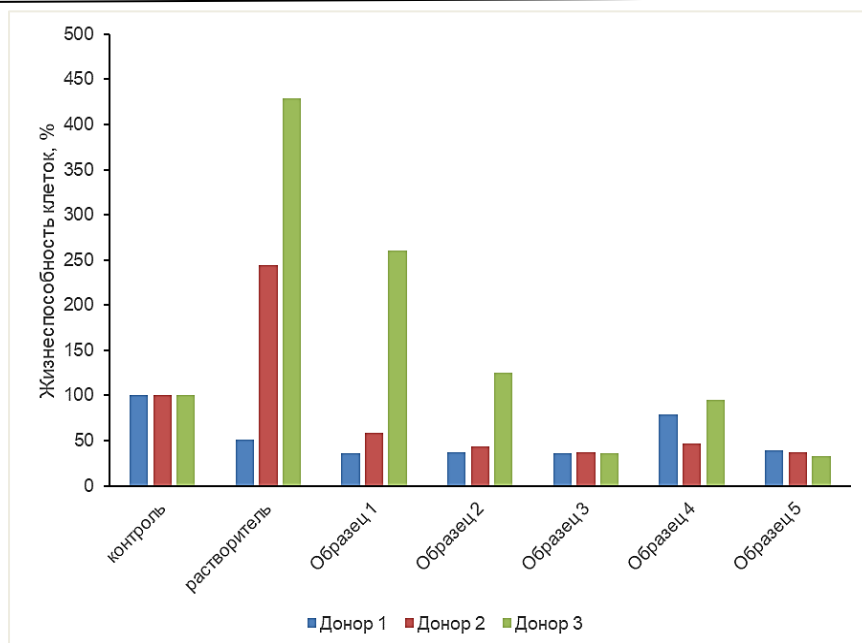
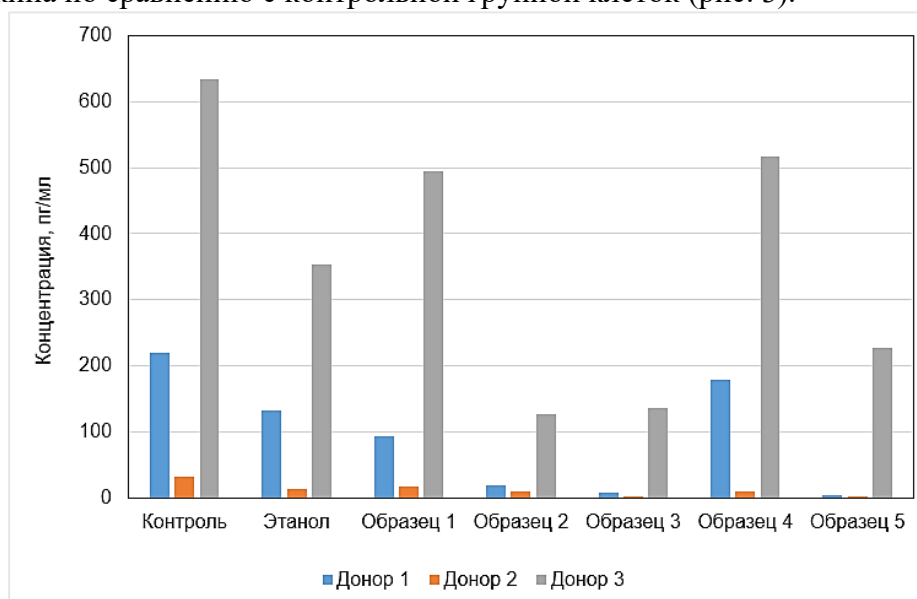


Рис. 2. Влияние образцов на жизнеспособность макрофагов

Показатели влияния образцов на секрецию провоспалительных цитокинов представлены на рисунках 3, 4, 5, 6. Определение концентрации $\text{TNF-}\alpha$ выявило, что добавление образцов, содержащих тритерпеновые кислоты, к культуре клеток существенно снижает выработку данного цитокина по сравнению с контрольной группой клеток (рис. 3).

Рис. 3. Влияние образцов на секрецию $\text{TNF-}\alpha$ макрофагами

Исследование по $\text{IL-1}\beta$ показало, что связь между выработкой макрофагами данного цитокина и составом среды не прослеживается в случае доноров 1 и 2 (рис. 4). В случае донора 3 обнаружено, что образцы 1, 2, 3 и 5 с относительно высоким содержанием тритерпеновых кислот по сравнению с образцом 4, подавляют выработку $\text{IL-1}\beta$. Исследование по фактору IL-6 также установило, что образцы с наибольшим содержанием тритерпеновых кислот (3 и 5) снижают выработку данного цитокина у доноров 1 и 2 (рис. 5). Исследование по фактору IL-10 показало, что добавление образцов с повышенным содержанием тритерпеновых кислот также отрицательно влияет на выработку данного цитокина у доноров 1 и 3 (рис. 6). При наименьшей концентрации тритерпеновых кислот в образце (4) наблюдается относительно высокая выработка цитокина по сравнению с контрольной группой у доноров 1 и 3.

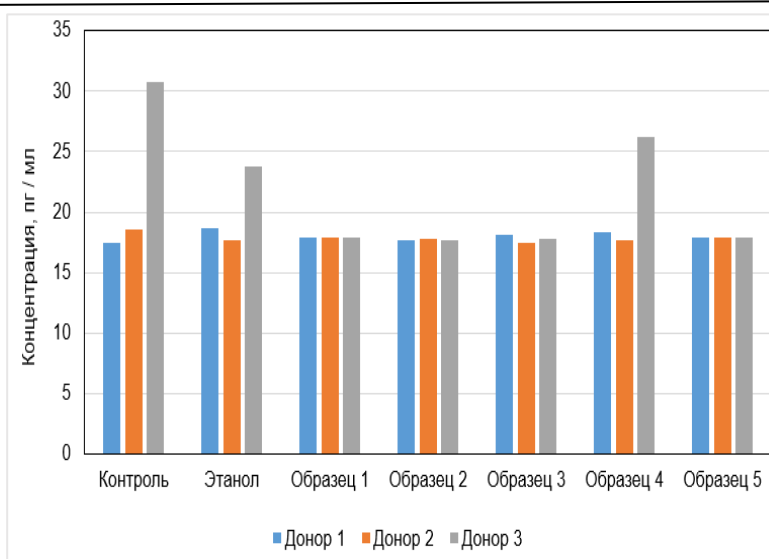
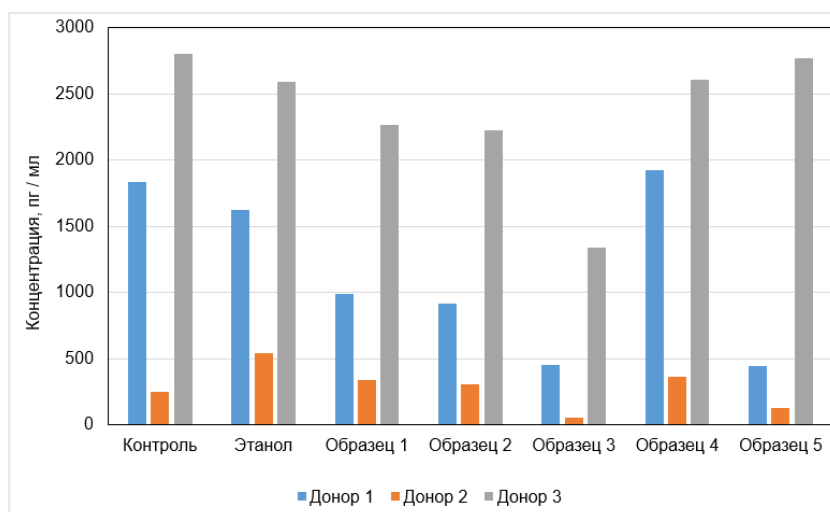
Рис. 4. Влияние образцов на секрецию IL-1 β макрофагами

Рис. 5. Влияние образцов на секрецию IL-6 макрофагами

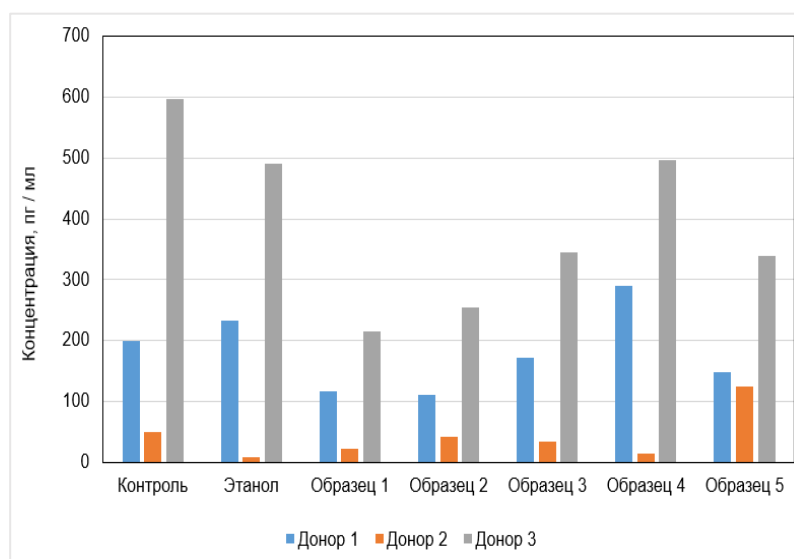


Рис. 6. Влияние образцов на секрецию IL-10 макрофагами

Заключение

Образцы хвойных экстрактов пихты сибирской обладают рядом биологических эффектов, таких как антирадикальная активность и противовоспалительный эффект. Так, экспериментально подтверждено, что экстракты проявляют антирадикальную активность в пределах от 47,0 до 60,5% относительно стандарта-антиоксиданта – аскорбиновой кислоты. Также прослеживается тенденция к возрастанию показателя антирадикальной активности с увеличением концентрации тритерпеновых кислот в образцах.

Оценка влияния экстрактов на жизнеспособность макрофагов установила прямую зависимость между низкой выживаемостью клеток и высоким содержанием тритерпеновых кислот. Лучшие показатели жизнеспособности (78,75; 46,53 и 94,81%) соответствуют содержанию тритерпеновых кислот менее 1%. Также экстракты с повышенной концентрацией тритерпеновых кислот демонстрируют противовоспалительный эффект, поскольку снижают выработку провоспалительных факторов TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10.

Между жизнеспособностью макрофагов и выработкой ими цитокинов обнаружена прямая связь: низкая жизнеспособность клеток соответствует низким показателям интенсивности выработки провоспалительных гуморальных факторов. Выработка цитокинов IL-6 и IL-1 β донор-специфичны, т.к. их секреция во многом не зависит от внешних воздействий.

Учитывая результаты экспериментальных исследований, можно говорить о том, что хвойные экстракты пихты сибирской с соответствующим уровнем содержания тритерпеновых кислот перспективны как противовоспалительные, противовирусные, иммуностимулирующие средства. Также могут быть эффективными при лечении инфекционных, аллергических, аутоиммунных заболеваний, т.к. оказывают непосредственное влияние на концентрацию цитокинов в межклеточной среде.

Благодарности. Результаты были получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России, проект № FSWM-2024-0009

Библиографический список

1. Калинкина Г.И., Е.Н. Сальникова, В.Н. Тихонов Лекарственные растения, сырье и фитопрепараты: учебное пособие, часть I. – Томск: СибГМУ, 2004. – 111 с:
2. Карпова Е. М. Новые подходы к оценке фармакологической активности полипrenoлов и тритерпеновых кислот из хвои пихты сибирской : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е. М. Карпова. – Томск, 2009. – 23 с.
3. Fulda S., Kroemer G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers // Drug discovery today. – 2009. – Vol. 14. – № 17-18. – P. 885-890
4. Ovesna Z. [et al.] Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds Minireview // Neoplasma. – 2004. – Vol. 51. – № 5. – P. 327-333
5. Popova A., Kzhyshkowska J., Nurgazieva D. [et al.] Pro- and anti-inflammatory control of M-CSF-mediated macrophage differentiation // Immunobiology. – 2011. – Vol. 216, is. 1-2. – P. 164-172
6. Saaby L., Nielsen C. H. Triterpene Acids from Rose Hip Powder Inhibit Self-antigen-and LPS-induced Cytokine Production and CD4+ T-cell Proliferation in Human Mononuclear Cell Cultures // Phytotherapy Research. – 2012. – Vol. 26. – № 8. – P. 1142-1147