

МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 574.2:635.21:615.9:591.6

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СОЛАНИНА

О.М. Плотникова, А.И. Рыкова

Курганский государственный университет, Курган

Представлены результаты комплексного исследования биологической активности соланина по отношению к бактериальной культуре, белым лабораторным мышам и посева овса. Выявлено, что соланин токсичен для бактериальной культуры в концентрациях до 10^{-4} моль/л. Для мышей не было выявлено летальных исходов при пероральном дробном введении в дозы соланина 4-хкратно превышающей LD_{50} , но влияние соланина в концентрациях до 10^{-7} моль/л приводило к обратимому снижению функций печени. Соланин в концентрации 10^{-9} моль/л оказывал благоприятное влияние на проростки овса, повышая активность каталазы, увеличивая содержание пигментов и снижая концентрацию аскорбата.

Ключевые слова: соланин, показатели крови, мышцы, бактериальная тест-культура, пигменты, каталаза, листья овса.

DOI: 10.26456/vtbio85

Введение. Соланин (*Solanum* – паслен), содержащийся в картофеле, как пищевом продукте, является контаминантом естественного происхождения (Орлин, 2011). В большом количестве он образуется на свету, поэтому картофель хранят обязательно в темном месте. Однако соланин содержится не только в картофеле, но и других растениях семейства пасленовых – это в первую очередь незрелые томаты и особенно баклажаны. Полулетальная доза (LD_{50}) соланина, применяемая как показатель опасности ядов, для мышей и крыс при внутрибрюшинном введении составляет 32 и 67 мг/кг соответственно, а при пероральном введении крысам – 590 мг/кг (Химия и токсикология, 2018). LD_{50} , исчисляемая в мг на кг, зачастую стала использоваться как доза в мг на человека, что приписывает соланину особую токсичность. В неочищенном картофеле соланина около 0,05% (50 мг соланина на 100 г картофеля), в очищенном – в 10 раз меньше; но в зеленом или проросшем картофеле повышается до 0,5% (Арестов, Толкач, 2000). Таким образом, исходя из LD_{50} 590 мг/кг, человеку массой 60 кг, чтобы получить полулетальную дозу, надо съесть около 70 кг неочищенного вареного картофеля. Реально

отравление соланином может получить животное небольшой массы, если его кормить особо позеленевшим сырым картофелем с кожурой, что не просто, если учесть горький вкус соланина.

Известно, что большинство алкалоидов, соланин не исключение, обладают высокой биологической активностью (Орехов, 1955). В микроконцентрациях этот алкалоид обладает противовоспалительным и ранозаживляющим действием, уничтожает вирусы и грибки, имеет противораковую активность. В соланине, который по строению является гликозидом, именно агликон стероидного строения (соланидин) непосредственно проявляет биологическую активность, в том числе токсические свойства (Генри, 1956).

Все выше сказанное вызвало наш интерес комплексного изучения как токсичности соланина на уровне бактериальной тест-культуры и основных биохимических показателей лабораторных мышей как теплокровных животных, так и биологической активности на проростках овса как тест-культуры высших растений.

Методика

1. Исследование токсичности растворов соланина с использованием бактериальной тест-культуры было проведено по изменению интенсивности биолюминесценции биосенсера «Эколюм». Этот метод широко используется для определения интегральной токсичности. Уменьшение интенсивности люминесценции бактерий при воздействии химических веществ пропорционально их токсичности. При оценке индекса токсичности анализируемые пробы классифицируются на три группы: I группа – значение токсичности меньше 20 – образец не токсичен; II – значение токсичности 20 - 49,9 – образец токсичен; III – значение токсичности от 50 и выше – образец сильно токсичен (Методика, 2004).

Определение индекса токсичности проводили по трем параллельным измерениям (в двух повторностях) контрольных, не содержащих токсических веществ, и опытных проб. Образцы модельного токсиканта и растворов соланина с концентрациями 10^{-2} и 10^{-3} моль/л были сильно токсичны (значение токсичности 99,3-99,9); растворы с концентрацией соланина 10^{-4} моль/л токсичны (34,7) и с концентрацией 10^{-5} моль/л и ниже – не токсичны.

Таким образом, при оценке токсичности растворов соланина от 10^{-2} до 10^{-10} моль/л методом биолюминесценции отмечено, что максимальной токсичностью обладают растворы 10^{-2} – 10^{-4} моль/л.

2. Исследование биохимических показателей крови лабораторных мышей проводили с использованием самцов белых лабораторных мышей линии СВА в возрасте 3-х месяцев массой 26 ± 2 г, которые содержались в стандартных условиях отдела лаборатории

физиологии животных. Работы с лабораторными мышами проводили с соблюдением принципов гуманного отношения к животным.

В работе было выполнено три серии экспериментов. В каждой серии животные были разделены на опытные и контрольные группы по 8-10 особей в каждой. Животным опытных групп вводили нейтрализованный раствор или взвесь соланина в воде соответствующей дозы в объеме 0,04-0,06 мл (внутримышечно) или 0,4-0,6 мл (перорально), животным контрольных групп вводили физиологический раствор. Взвеси соланина, вводимые перорально, брали из расчета (моль/л), чтобы животное получило нужную дозу соланина на уровне ЛД₅₀. После эвтаназии декапитацией у животных брали цельную кровь, после центрифугирования получали плазму.

В первой серии исследовано влияние высоких доз соланина, соответствующих ЛД₅₀. Мышам первой опытной группы однократно перорально вводили по 600 мг/кг (соответствует одной полуметальной дозе); мышам второй опытной группы – двукратно по 1200 мг/кг (соответствует четырехкратной ЛД₅₀ дозе 2400 мг/кг); декапитацию проводили через 6 часов после введения. Во второй серии изучали острую токсичность соланина в дозе 200 мг/кг через 1, 2 и 3 суток после перорального введения растворов соланина концентрацией 10⁻² моль/л («временной эксперимент»). В третьей серии изучено влияние различных доз соланина (2, 0,2, 0,02, 0,002 мг/кг) после внутримышечного введения растворов соланина в концентрациях 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷ и 10⁻¹² моль/л («дозозависимый эксперимент»).

В плазме крови животных определяли показатели, характеризующие метаболизм белков и белковообразующую функцию печени: общий белок (биуретовый метод), альбумин (с бромкрезоловым зеленым), мочевины (уреазно-салицилатный метод), активность ферментов холинэстеразы (реакция с бутирилтиохолином), аланин- и аспаратаминотрансфераз и лактатдегидрогеназы (кинетический УФ-метод). Для определения показателей использовали наборные методы фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) и полуавтоматический биохимический анализатор «Stat Fax 3300».

Экспериментальные данные в каждой серии обрабатывали методами непараметрической статистики (Гланц, 1998). Результаты исследования представляли в виде медианы, на основании которой считали различия значений в процентах в опытных группах относительно контрольных групп, принимая контроль за 100%, чтобы исключить изменения, связанные с внешними воздействиями на организм животного. Интерквартильные размахи представляли в виде 25-го и 75-го перцентилей. Достоверность различий между двумя независимыми выборками оценивали с использованием W-критерия

Вилкоксона. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали менее 0,05.

Результаты и обсуждение. В первой серии эксперимента медианы и интерквартильные интервалы в контрольной группе мышей (10 особей) составили: для альбумина – 30,9 (28,9 ÷ 31,7) г/л, для мочевины – 5,8 (5,6 ÷ 7,9) ммоль/л, АСТ – 198 (161 ÷ 225) Е/л, АЛТ – 60 (44 ÷ 63) Е/л, ХЭ – 7969 (7440 ÷ 8289) Е/л, ЛДГ – 2035 (1328 ÷ 3155) Е/л. По результатам эксперимента после перорального введения высоких доз соланина (табл. 1), соответствующих одной полулетальной дозе (600 мг/кг) и четырехкратной полулетальной дозе (2400 мг/кг), было выявлено, что, достоверно максимально снижались активности аминотрансфераз (на 22 и 38% для АСТ и АЛТ соответственно) и ЛДГ (на 47%); при этом снижение активности АЛТ происходило на 28-31% независимо от вводимой дозы соланина. Содержание альбумина в плазме и активность холинэстеразы оставались в норме.

Таблица 1

Изменение показателей в плазме крови после перорального введения соланина в дозах 600 и 2400 мг/кг

Доза соланина	Альбумин	Мочевина	ХЭ	АСТ	АЛТ	ЛДГ
1-кратный ЛД 50	98	80*	103	90	69*	81
4-кратный ЛД 50	101	98	103	78*	62*	53*

Примечание. * - достоверные различия по сравнению при $p < 0,05$.

Таким образом, высокие дозы соланина (на уровне ЛД₅₀ и выше) в течение 6-12 часов не приводили к летальным исходам мышей; содержание альбумина и мочевины, одних из самых доступных для определения показателей интоксикации организма, оставалось в норме (для альбумина) или снижалось (для мочевины). Однако соланин в дозе 4-хкратно превышающей ЛД₅₀ оказывал влияние на печень, о чем говорит снижение активности аминотрансфераз, особенно АЛТ и ЛДГ.

Во второй серии в остром эксперименте медианы (интерквартильные интервалы) в контрольной группе мышей (9 особей) составили: для альбумина – 33,4 (32,6 ÷ 34,1) г/л, мочевины – 6,2 (5,4 ÷ 6,8) ммоль/л, АСТ и АЛТ – 306 (290 ÷ 330) и 70 (67 ÷ 74) Е/л, ХЭ – 6322 (5339 ÷ 6923) Е/л, ЛДГ – 2382 (2197 ÷ 2491) Е/л. Показано, что в остром эксперименте после введения соланина в дозе 200 мг/кг, содержание мочевины достоверно возрастало через сутки и оставалось высоким (140-155% от контроля), что сопровождалось некоторым снижением уровня общего белка и альбумина. Это может указывать на повышение катаболизма белка и на некоторое нарушение функций

почек. Активность ферментов, характеризующих функции печени, изменялась достоверно лишь для АСТ в первые сутки, снижаясь на 31%, и быстро восстанавливалась к концу третьих суток. Достоверно повышенной оставалась активность холинэстеразы в 1,24-1,32 раза, что указывает на достаточную белковообразующую активность печени при компенсации потерь белка, а также некоторый стресс, вызванный действием алкалоида. Таким образом, невысокие дозы соланина после разового введения животному вызвали незначительное увеличение катаболизма белковых молекул, что сопровождалось ростом концентрации мочевины и компенсировалось увеличением синтеза белков в печени, что сопровождалось ростом активности холинэстеразы.

В третьей серии после внутримышечного введения растворов соланина низких концентраций 10^{-4} – 10^{-7} моль/л, что соответствует дозам 2 – 0,002 мг/кг («дозозависимый эксперимент», табл. 2), было отмечено отсутствие достоверных изменений альбумина и активности холинэстеразы при концентрациях соланина ниже 10^{-4} моль/л. Однако соланин вызывал устойчивое повышение активности АЛТ и понижение активности ЛДГ в среднем в 1,3 раза.

Таблица 2

Изменение биохимических показателей (в процентах от контроля) в плазме крови лабораторных мышей после воздействия соланина в различных дозах

Концентрации растворов соланина	Альбумин	Мочевина	ХЭ	АСТ	АЛТ	ЛДГ
	после внутримышечного введения соланина в дозах 2-0,002 мг/кг (10^{-4} - 10^{-7} моль/л)					
10^{-4} моль/л	98	148*	124*	75*	145*	79
10^{-5} моль/л	98	138*	93	75*	113	76
10^{-6} моль/л	111	125*	103	110	138*	66*
10^{-7} моль/л	108	113	101	101	131*	71*

Примечание. * - достоверные различия по сравнению при $p < 0,05$.

Снижение активности ЛДГ может быть связано с увеличением аэробности процессов (эффект Пастера) и с инактивацией ЛДГ как цинк-содержащего фермента. Повышение активности АЛТ указывает на нарушение функций печени, которое происходит независимо от этиологии, поэтому повышение активности АЛТ считается ранним маркером заболеваний печени (Плотникова и др., 2011).

Таким образом, выявлено, что соланин в дозах на уровне LD_{50} и выше не приводил к летальным исходам мышей в течение 6-12 часов, но оказывал влияние на функции печени; разовое воздействие соланина в невысоких дозах сопровождалось компенсационным ростом активности холинэстеразы; соланин при довольно низких

дозах, тем не менее, приводил к снижению активности ЛДГ и повышению активности АЛТ, что указывает на нарушение функций печени.

3. Исследование содержания пигментов в листьях овса сорта «Скакун». Семена овса (по 100 штук после «протравления» в растворе перманганата) проращивали в трех параллелях в чашках Петри на питательной среде Хогланда-Снайдерса с добавлением соланина в опытных образцах. Всхожесть семян составила: при концентрации соланина 10^{-5} моль/л 75% от контроля, при 10^{-7} и 10^{-11} моль/л – 100% от контроля; при концентрации 10^{-3} моль/л семена не проросли.

В проростках овса через 10 дней после начала проращивания семян определяли содержание пигментов - хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов (с использованием для расчета формул Вернера и Веттштейна (Щукин, Громов, 2008; Шлык, 1971), аскорбат (по способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол (Филиппович и др., 1982) и активность каталазы (по объему выделившегося кислорода при разложении пероксида водорода (Чупахина, 2000).

Содержание хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов в контрольных образцах проростков овса составило $1,068 \pm 0,004$, $0,422 \pm 0,011$ и $0,220 \pm 0,002$ мг/г соответственно, что соответствует содержанию пигментов в зеленых частях растений в норме (Гавриленко, 2003). Показано, что в проростках овса, выращенных на смесях с добавлением соланина 10^{-5} моль/л, содержание всех пигментов снижалось на 15-22%, а при концентрации 10^{-9} моль/л – возрастало на 30-39% от контроля; в концентрации 10^{-7} и 10^{-11} моль/л влияние соланина на растения незначительно или практически отсутствовало. Отношение суммы хлорофиллов к каротиноидам ((*a*+*b*)/*c*) варьировало в интервале 6,5-7,4 и было наименьшим в опыте с концентрацией соланина 10^{-9} моль/л за счет повышенного содержания каротиноидов (0,306 мг/г). Рост содержания хлорофиллов свидетельствует о повышении способности растений к поглощению света. Результатом подобных изменений может быть повышение продуктивности растений (Евдокимова, 2013). Увеличение каротиноидов, выполняющих фотопротекторную и антиоксидантную функции, способствует подавлению окислительных процессов в растительных тканях и большему поглощению света.

Содержание аскорбата в контрольных образцах проростков составляло $7,33 \pm 0,05$ мг%. В проростках овса после воздействия соланина содержание аскорбата снижалось, максимально на 20% при проращивании с соланином концентрации 10^{-9} моль/л ($5,86 \pm 0,13$ мг%), что может свидетельствовать об эффективном функционировании защитной системы и об отсутствии стресса у растений. Активность каталазы в контрольных образцах составила

60,7 ± 0,3 мл/(г*мин). Под влиянием соланина активность каталазы во всех случаях увеличивалась, максимально при концентрациях 10⁻⁹ и 10⁻¹¹ моль/л – на 18 и 16% соответственно, что составило 71,5±0,2 и 70,4±0,5 мл/(г*мин), что свидетельствует об активных восстановительных процессах, а значит, о достаточном уровне устойчивости растений к стрессам.

Таким образом, соланин при длительном воздействии в концентрации 10⁻³ моль/л препятствовал прорастанию семян овса, однако в концентрации 10⁻⁹ моль/л оказывал благоприятное влияние на растения, повышая активность каталазы, увеличивая содержание пигментов и снижая содержание аскорбата.

Заключение. Анализ экспериментального материала показал, что соланин токсичен для бактериальной культуры в концентрациях до 10⁻⁴ моль/л; для теплокровных животных (мышей) не было выявлено летальных исходов, но влияние соланина в концентрациях до 10⁻⁷ моль/л приводило к обратимому снижению функций печени; в концентрации 10⁻⁹ моль/л соланин оказывал благоприятное влияние на растения, что может быть использовано в агротехнологиях.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории биотестирования Регионального центра по Курганской области в помощи при исследовании токсичности соланина на бактериальной тест-культуре.

Список литературы

- Арестов И.Г., Толкач Н.Г.* 2000. Ветеринарная токсикология. Минск: Ураджай. 344 с.
- Гавриленко В. Ф.* 2003. Большой практикум по фотосинтезу / Под ред. И.П. Ермакова. М.: Академия. 250 с.
- Генри Т.А.* 1956. Химия растительных алкалоидов. М.: Хим. лит. 904 с.
- Гланц С.* 1998. Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 459 с.
- Евдокимова Е.В.* 2013. Содержание фотосинтетических пигментов в листьях растений муссонного тропического леса в разные сезоны года // *Фундаментальные исследования.* № 10 (часть 6). С. 1260-1265.
- Методика* определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению интенсивности бактериальной биолюминесценции тест-системой «Эколюм». 2004. М.: МПР РФ.
- Орехов А.П.* 1955. Химия алкалоидов. Москва. 863 с.
- Орлин Н.А., Разумова С.С.* 2011. Выделение сапонинов из кожуры позеленевшего картофеля // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* № 6. С. 153-154.
- Плотникова О.М., Матвеев Н.Н., Савинова И.В., Корепин А.М., Лунева С.Н.* 2011. Оценка влияния низких доз метилфосфоната на теплокровных животных по биохимическим показателям крови мышей // *Естественные науки.* № 1 (51). С. 32-37.

- Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. 1982. Практикум по общей биохимии. М.: Просвещение. 311 с.
- Химия и токсикология. URL: <http://chemister.ru/index.html> (дата обращения 11.02.2018).
- Чупахина Г.Н. 2000. Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум. Калининград: Изд-во Калинингр. ун-та. 59 с.
- Шлык А.А. 1971. Определение хлорофиллов и каротиноидов в экстрактах зеленых листьев. В кн. Биохимические методы в физиологии растений / под ред. О.А. Павлиновой. М.: Наука. С. 154-170.
- Щукин В.Б., Громов А. 2008. Практикум по физиологии растений. Оренбург: Изд. центр ОГАУ, 2008. 176 с.

COMPLEX STUDY OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOLANINE, USING BACTERIAL CULTURE, WARM-BLOODED ANIMALS AND HIGHER PLANTS

О.М. Plotnikova, A.I. Rykova
Kurgan State University, Kurgan

The results of a complex study of the biological activity of solanine in relation to bacterial culture, white laboratory mice and seed oats are presented. We found that solanine is toxic to bacterial culture in concentrations up to 10^{-4} mol/l. For mice, no fatal outcomes were detected by oral administration of fractional doses of solanine 4-fold higher than LD50, but the effect of solanine in concentrations up to 10^{-7} mol/l resulted in a reversible decrease in liver function. Solanine in a concentration of 10^{-9} mol/l had a beneficial effect on oat seedlings, increasing the activity of catalase, increasing the content of pigments and reducing the concentration of ascorbate.

Keywords: *solanine, blood counts, mice, bacterial culture test, pigments, catalase, oat leaves.*

Об авторах:

ПЛОТНИКОВА Ольга Михайловна – доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВО «Курганский государственный университет», 640020, Курган, ул. Советская, 63, стр. 4, e-mail: plotnikom@yandex.ru.

РЫКОВА Анна Ивановна – кандидат химических наук, доцент ФГБОУ ВО «Курганский государственный университет», 640020, Курган, ул. Советская, 63, стр. 4, e-mail: raicom68@yandex.ru.

Плотникова О.М. Комплексное исследование биологической активности соланина / О.М. Плотникова, А.И. Рыкова // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2019. № 2(54). С. 218-225.