

УДК 542; 544.77.022.532

СРАВНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ФИТОХИМИЧЕСКИХ КОМПОЗИЦИЙ В НАТИВНОЙ И ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМАХ

О.А. Умнова

(Российский государственный социальный университет; НПО «Альпика»,
г. Ставрополь; e-mail: umnova@alpika.ru)

Проведено сравнение биологической активности фитохимических композиций в нативной и липосомальной формах, а также изучение мембраностабилизирующих и антиоксидантных свойств фитокомпозиций противовоспалительного и ранозаживляющего действия на клеточные стенки простейших.

Ключевые слова: неспецифический биосенсор, *Paramecium caudatum*, липосомы, фармахимия, биологическая активность.

В настоящее время в государственной фармакопее РФ разрешено применение более 200 видов лекарственного растительного сырья (ЛРС). Большую часть растительного сырья используют для получения водных извлечений и спиртосодержащих лекарственных средств [1]. Интенсивно исследуется возможность получения синергетических биологических эффектов при использовании сочетаний лекарственных растений, а также при интенсификации или изменении процессов экстракции с целью избирательного выделения биологически активных веществ (БАВ) [2]. Кроме того создаются новые транспортные формы БАВ, например липосомальные, что обусловлено уникальным комплексом физико-химических и биологических свойств данных микрочастиц, проявляемых *in vivo* и *in vitro*. Считается, что липосомы могут доставлять лекарственные вещества к больному органу – мишени, в том числе и внутрь кожного покрова [3]. Показано, что для транспортировки внутрь кожного покрова как лекарственных, так и биологически активных веществ липосомальные частицы должны иметь в оболочке оптимальное соотношение гидрофильных и гидрофобных участков молекул [4]. Однако до настоящего времени остается невыясненным вопрос о влиянии липосомальных частиц на мембраностабилизирующие и антиоксидантные свойства клеточных мембран.

Цель данной работы – сравнение биологической активности фитохимических композиций в нативной и липосомальной формах, а также изучение мембраностабилизирующих и антиоксидантных свойств фито-

композиций противовоспалительного и ранозаживляющего действия на клеточные стенки простейших.

Экстрагирование БАВ из растительного сырья проводили по методикам, описанным ранее [5–6]. Для конструирования липосом использовали фосфолипиды животного и растительного происхождения в соотношении 1:3, выделенные по методикам [7]. В качестве животного сырья мы взяли головной мозг свиней, в качестве растительного сырья – отходы маслоэкстракционных заводов (гидрофусы и фосфатиды). Липосомальные формы готовили из растительного сырья по методике [8], при этом жирорастворимые БАВ встраивались в мембраны липосом, а водорастворимые – внутрь липидной везикулы.

В табл. 1 представлены полученные данные по фитохимическому составу БАВ из растительного сырья в зависимости от используемого экстрагента [9]. Из приведенных результатов следует, что экстрагенты различной природы позволяют извлекать различные жирорастворимые БАВ.

Результаты количественного определения суммы БАВ липосомальной фитокомпозиции листьев лавра благородного и травы донника лекарственного показали, что независимо от места произрастания сырья содержание суммы хлорофиллов в исследуемом фитокомплексе всегда составляет около $32 \pm 2\%$, и это позволяет конструировать фитоэкстрагенты со стабильным фармакологическим эффектом в области антимикробной активности.

В ходе исследований мы также выявляли степень биологической активности экстрактов отдельных лекарственных трав и оптимальное количество

Т а б л и ц а 1

Химический состав природных соединений в зависимости от природы экстрагента

Экстрагент \ Лекарственное растение	Вода горячая	Водно-спиртовая смесь (70%)	Хлороформ/масло
Зверобой продырявленный	дубильные вещества, следы флавоноидов, белки, алкалоиды	алкалоиды, дубильные вещества, органические кислоты, флавоноиды	гиперицин, терпены, псевдогиперицин, эфирное масло, каротиноиды, сесквитерпены
Календула лекарственная	дубильные вещества, следы флавоноидов, белки, органические кислоты	флавоноиды, календен, следы каротиноидов, органические кислоты, кверцетин	каротиноиды, ликопин, виолоксантин, рубиксантин, пентадециловая, салициловая кислоты, триглицериды, фитостерины
Ромашка аптечная	горечи, слизи, камедь, холин, аскорбиновая кислота, следы эфирного масла, флавоноидов	флавоноиды, кумарины, следы эфирного масла, никотиновая, салициловая кислоты, хамазулен	сесквитерпены, терпены, эфирное масло, кадинен, каприловая, салициловая кислоты, стеролы, каротиноиды, триглицериды, фитостерин, воск
Шалфей лекарственный	полисахариды, дубильные вещества, следы флавоноидов, эфирного масла	флавоноиды, рутин, кверцетин, дубильные вещества, следы сальвина, эфирного масла	сальвин, цинеол, пинен, борнеол, камфора, урсоловая, олеаноловая кислоты
Крапива двудомная	дубильные вещества, муравьиная, пантотеновая кислоты, витамин В ₂ гистамин	дубильные вещества, органические кислоты, гликозиды, ксантофилл, хлорофилл	протопорфирин, каротиноиды, витамин К, β-каротин, ксантофилл, хлорофилл

монотрав в фитокомпозиции. В качестве биомодели использовали монокультуру клеток *Paramecium caudatum*. Время экспозиции составило 3–7 сут. В каждом опыте условия содержания инфузорий были одинаковы. В одной капле (0,05 мл) находилось 5–8 особей, температура составляла 20–26°C, рН 6,2–7,2 [10].

Для подбора количественного содержания лекарственных трав в составе фитокомпозиции (ФК) изучались различные варианты соотношения: ФК № 1 – все лекарственные растения взяты в равных частях; ФК № 2 – отношение лавра благородного и донника лекарственного к комплексу ромашка–зверобой–крапива составляет 2:1; ФК № 3 и ФК № 4 – отношение лавра и донника к другим составляющим составляет 4:1 и 8:1 соответственно. За критерии биологической активности мы приняли различие в концентрации живых парameций в опытной и контрольной пробах, а также величину пороговой концентрации, вызывающей изменения эволюционных параметров [11]. В

контроле парameции культивировались в растворе среды Лозина–Лозинского. В табл. 2 приведены данные по фитохимическому составу и оценке биологической активности экстрактов отдельных лекарственных трав и ФК с использованием простейших в качестве биотеста.

Биологически активными в направлении искомого биостатического эффекта оказались экстракты донника, лавра, а также ФК № 3 и № 4, для которых пороговая концентрация составила 1,010–1,000, темп размножения >10.

Для экстрактов ФК № 1 и № 2 пороговая концентрация составила 1,0×10⁻¹, а среднее значение темпа размножения – >20. Результаты исследования биологической активности растворов листьев крапивы и цветов ромашки аптечной, содержащих флавоноиды, тритерпеновые соединения, органические кислоты, каротин и гликозиды, свидетельствуют о стимулирующем действии размножения (пороговая концентрация 1,0×10⁻³, темп размножения >30 особей). Трава зве-

Т а б л и ц а 2

Оценка биологической активности экстрактов лекарственных трав

Объект исследования	Химический состав природных соединений	Критерии биологической активности			
		пороговая концентрация	температура размножения	размер и форма клеток (мкм)	характер движения
Контроль	солевая среда, пептон	–	>20	90–100 (удлиненная)	активны
Ромашка (цветки)	флавоноиды, тритерпеновые соединения, органические кислоты, каротин	$1,0 \times 10^{-3}$	>30	90–200 (эллипсоид)	активны
Зверобой (травя)	флавоноиды, дубильные вещества, органические кислоты	$1,0 \times 10^{-1}$	>20	50–80 (округлая)	замедленное
Лавр (листья)	тритерпеновые соединения, танины, сапонины, фенилкарбоновые кислоты	$1,0 \times 10^{-1}$	>10	50–80 (округлая)	замедленное
Крапива (листья)	гликозиды, органические кислоты, каротиноиды	$1,0 \times 10^{-3}$	>30	90–200 (эллипсоид)	активны
Донник (травя)	тритерпеновые соединения, флавоноиды, гликозиды, дубильные вещества	$1,0 \times 10^{-1}$	>10	50–80 (округлая)	замедленное
ФТК № 1	комплекс биологически активных соединений	$1,0 \times 10^{-1}$	>20	50–80 (округлая)	замедленное
ФТК № 2	комплекс биологически активных соединений	$1,0 \times 10^{-1}$	>20	50–80 (округлая)	замедленное
ФТК № 3	комплекс биологически активных соединений	$1,0 \times 10^{-1}$	>10	50–80 (округлая)	замедленное
ФТК № 4	комплекс биологически активных соединений	$1,0 \times 10^{-1}$	>10	50–80 (округлая)	замедленное

робоя по биостатическому эффекту занимает промежуточное положение между первой и второй группами. При этом установлено, что БАВ экстрактов всех лекарственных трав и ФК не оказывают токсического действия на парameции.

Интерес представляло дальнейшее исследование степени активности экстрактов лавра благородного, донника и зверобоя продырявленного, содержащих

тритерпеновые соединения, танины, сапонины, фенилкарбоновые кислоты, флавоноиды, гликозиды и дубильные вещества – ингибиторы размножения простейших, а также определение оптимального процентного соотношения компонентов ФК для получения искомого терапевтического эффекта.

В ходе исследований на биомодели установлено, что интактные липосомы и липосомы с ФК (табл. 3)

не обладают токсическим эффектом. Подтверждено, что интактные липосомы обладают самостоятельной биологической активностью, поскольку в их среде происходит размножение парameций. Липосомы с ФК при изучении степени влияния на аппарат размножения проявили биостатическую активность.

Определение микробиологической безопасности различных лекарственных трав и фитокомпозиций, прошедших первоначальный отбор с помощью биомодели *Paramecium caudatum*, проводилось с использованием биомодели *Staphylo-coccus aureus* (референтный штамм *Staphylococcus aureus* 209 P). Контроль стерильности экстрактов в интактной и липосомальной формах осуществлялся согласно СанПиН 1.2.681-97. Изучены микробиологические показатели безопасности масляных экстрактов и липосомальных форм вышеперечисленных лекарственных трав, а также фитокомпозиций данных ЛРС. Бактерицидную и/или бактериостатическую активность экстрактов и ФК в нативной и липосомальной формах в отношении патогенного стафилококка изучали методом серийных разведений в жидкой питательной среде [2]. Результаты исследования представлены в табл. 4, 5.

Согласно полученным данным, масляные экстракты зверобоя, лавра, донника, ромашки и ФК № 1–4 обладают бактерицидной активностью по отношению к патогенному стафилококку. Результаты, приведенные в табл. 4, свидетельствуют о том, что для полу-

чения минимальной ингибирующей концентрации экстрактов зверобоя, донника, ромашки и ФК № 1, 2, 4 требуется разведение 1:2, а экстрактов лавра и ФК № 3 – разведение 1:4. Это позволяет высказать предположение о сильном противовоспалительном действии данных средств. Экстракт крапивы, содержащий гликозиды, органические кислоты и каротиноиды, проявил бактерицидную активность в отношении стафилококка только в цельном виде.

Бактериостатическую активность экстракты зверобоя, донника и ФК № 1 показали в разведениях от 1:4 до 1:16, экстракт ромашки и ФК № 2, 4 – в разведениях 1:4–1:8, экстракты лавра и ФК № 3 – в разведениях 1:8–1:16, проявив наибольшую активность в отношении стафилококка. Экстракт крапивы обладает бактериостатическим действием в разведении 1:2–1:4, являясь наименее активным в отношении стафилококка.

Данные, приведенные в табл. 5, свидетельствуют о том, что для получения минимальной ингибирующей концентрации липосомальных форм экстрактов ФК № 1, 2, 4 требуется разведение 1:4, а экстрактов ФК № 3 – 1:7. Бактериостатическое действие на патогенный стафилококк проявилось для ФК № 1, 2, 4 при разведении 1:8–1:30, а для ФК № 3 – при разведении 1:16–1:32.

Таким образом, в ходе проведения экспериментов получены данные о том, что разработанные компози-

Таблица 3

Определение степени токсичности и биологической активности липосомальных эмульсий в хроническом опыте (время экспозиции 7 сут)

Объект исследования в пороговой концентрации	Количество особей в 5×10^{-2} мл среды	Показатели токсичности			
		характер движения	форма клеток	наличие размножения, количество особей в 5×10^{-2} мл среды	гибель клеток
Интактные липосомы	3–5	без остановки	округлая	5–10	отсутствует
Липосомы с ФК № 3	3–5	без остановки	эллипсоидная	3–5	отсутствует
Контроль (среда Лозина–Лозинского)	3–5	без остановки	эллипсоидная	20–30	отсутствует

Т а б л и ц а 4

Определение бактерицидной и бактериостатической активности масляных экстрактов лекарственных трав

Масляные экстракты лекарственных трав	Количество КОЕ стафилококка при высеве из разведенных экстрактов										Количество КОЕ стафилококка при высеве из экстракта	
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	экстракт	рост культуры			
Донник	–	2×10^1	10^2	10^3	3×10^5	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	–	–			
Зверобой	–	2×10^2	8×10^2	5×10^3	9×10^5	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	–	–			
Крапива	10^3	5×10^3	7×10^5	3×10^7	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	–	–			
Ромашка	–	8×10^2	10^5	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	–	–			
Лавр	–	–	10^1	5×10^3	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	–	$2,5 \times 10^9$			
ФК №1	–	1×10^4	3×10^2	5×10^3	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	–	–			
ФК №2	–	2×10^2	5×10^3	3×10^7	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	–	–			
ФК №3	–	–	3×10^2	5×10^3	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	–	–			
ФК №4	–	3×10^2	5×10^3	3×10^7	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^9$	–	–			

Примечания. КОЕ – колониеобразующие единицы; (–) – отсутствие роста микрофлоры.

Т а б л и ц а 5

Определение бактерицидной и бактериостатической активности липосомальной формы фитоконпозиций экстрактов лекарственных трав

Липосомальная форма экстрактов	Количество КОЕ стафилококка при высеве из разведений экстрактов								Количество КОЕ стафилококка при высеве из контроля:	
	цельный экстракт	11:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	экстракт	рост культуры
ФК № 1	–	–	–	8	3×10^1	5×10^1	$1,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	–	$1,8 \times 10^9$
ФК № 2	–	–	–	2	7×10^3	3×10^4	$1,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	–	
ФК № 3	–	–	–	–	8	2×10^4	$1,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	–	
ФК № 4	–	–	–	2	9×10^2	4×10^5	$1,8 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	–	

Примечания. КОЕ – колониеобразующие единицы; (–) – отсутствие роста микрофлоры.

ции экстрактов лекарственных трав в нативной и липосомальной формах по своим микробиологическим показателям соответствуют требованиям СанПиН 1.2.681-97 и являются безопасными для использования их в процессе производства липосомальных средств противовоспалительного и ранозаживляющего действия. Данные препараты обладают бактерицидной и бактериостатической активностью в отношении патогенного *Staphylococcus aureus*.

Изучение синергизма действия трав в фитокомпозиции позволило подобрать оптимальное количественное соотношение лекарственных трав, обладающих эффективными бактерицидным и бактериостатическим действиями, и подтвердить полученные в ходе экспериментов на биомодели *Paramecium caudatum* данные о биостатической активности ФК № 3.

Экспериментально доказано, что ФК, в которой отношение содержания комплекса «центральных трав» (лавр–донник) по отношению к комплексу ромашка–зверобой–крапива составляет 4:1, обладает наиболее выраженным бактерицидным действием как в интактной, так и в липосомальной формах. Следует отметить, что липосомальная форма данной композиции по сравнению с композицией тех же лекарственных трав в нативной форме вдвое увеличивает свои бактерицидную и бактериостатическую активности (1:8 против 1:4). В процессе конструирования липосомальных средств противовоспалительного и ранозаживляющего действия целесообразно использовать именно такое процентное соотношение ЛРС, входящих в фитокомпозицию.

Для более полной характеристики активного начала противовоспалительных и ранозаживляющих средств

необходимо изучение протективных свойств исследуемых композиций [12]. Испытаниям на мембраностабилизирующую и антиоксидантную активность подвергались ФК № 1–4 с разным процентным содержанием БАВ в липосомальной форме.

Результаты изучения мембраностабилизирующих свойств концентратов показаны на рис. 1. Из приведенных диаграмм видно, что все четыре максимальных пика приходится на 30%-е композиции. При разрушении клеточных структур 3%-й перекисью водорода срок жизни биомодели, выдержанной в 30%-й среде БАВ в интактной форме, увеличивается на 123 ± 5 с по сравнению с контролем, в липосомальной форме – на 207 ± 7 с, т.е. на 40,6%. Следует обратить внимание на тот факт, что при увеличении концентрации БАВ выше 30% мембраностабилизирующие свойства композиций ухудшаются.

Пики антиоксидантной активности (рис. 2) также проявляются при 30%-й концентрации БАВ. При разрушении клеточных структур 96%-м этиловым спиртом срок жизни биомодели, выдержанной в 30%-й среде БАВ в интактной форме, увеличивается на 174 ± 7 с по сравнению с контролем, а в липосомальной – на 227 ± 5 с, т.е. на 22,5%. Композиции ЛРС с меньшим и большим процентным содержанием БАВ спустя трое суток дают ощутимо меньший прирост *Paramecium caudatum*, что свидетельствует о снижении биологической активности и ухудшении мембраностабилизирующих и антиоксидантных свойств.

Таким образом, в результате изучения действия фитохимического состава композиций лекарственных трав противовоспалительного действия в на-

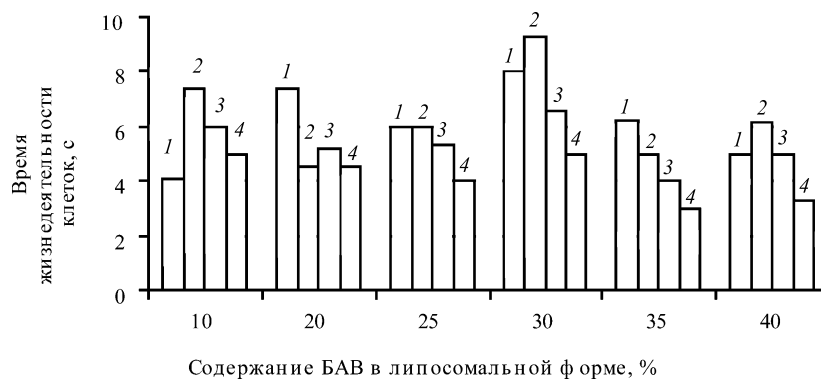


Рис. 1. Результат изучения мембраностабилизирующих свойств экстрактов ЛРС с разным содержанием БАВ в липосомальной форме в разных ФК: 1 – № 1, 2 – № 2, 3 – № 3, 4 – № 4

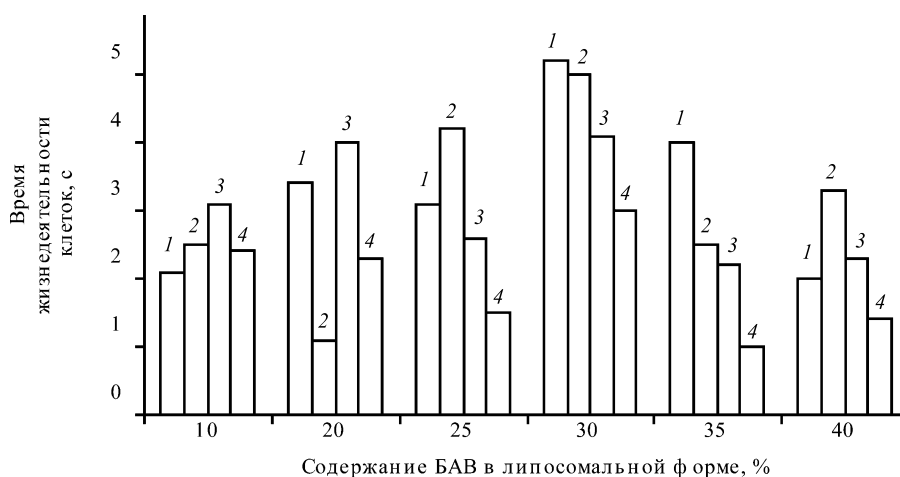


Рис. 2. Результат изучения антиоксидантных свойств экстрактов ЛРС с разным содержанием БАВ в липосомальной форме в разных ФК: 1 – № 1, 2 – № 2, 3 – № 3, 4 – № 4

тивной и липосомальной формах на клеточные модели показана перспективность использования липосомальной формы для конструирования инновационных фитопрепаратов.

Экспериментально доказано, что бактерицидная и бактериостатическая активность липосомальной формы фитокомпозиции, в которой преобладают тритерпеновые соединения, танины, сапонины, фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, гликозиды и дубильные вещества, практически вдвое выше (1:8 против 1:4) ее нативной формы.

Результаты исследования мембраностабилизирующих и антиоксидантных свойств также подтвердили преимущество липосомальной формы фитокомпози-

ций. При разрушении клеточных структур 3%-й перекисью водорода срок жизни биомодели, выдержанной в 30%-й среде БАВ в липосомальной форме, увеличивается на 40,6 % по сравнению с нативной формой композиции. Антиоксидантные показатели липосомальной формы ФК увеличиваются на 22,5% по сравнению с традиционной формой композиции лекарственных трав.

Установлено, что при правильном подборе экстрагента можно извлекать из лекарственных растений соединения определенного спектра для получения средств заданного фармакотерапевтического действия, а это дает возможность оптимизировать процесс экстракции БАВ из растительного сырья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горбунова Т.А. Лечение растениями: Рецептурный справочник. М., 1994.
2. Носенко М.А. Дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь, 2004.
3. Владимиров Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
4. Марголина А.А., Эрнандес Е.И., Зайкина О.Э. Новая косметология. М., 2000.
5. Коренман И.М. Экстракция органических веществ. Горький, 1973.
6. Пономарев В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья. М., 1976.
7. Кузякова Л.М., Ефременко В.И. Медикаментозное преодоление анатомических и клеточных барьеров с помощью липосом. Ставрополь, 2000.
8. Кузякова Л.М. // Вестн. Моск. ун-та. Сер.2. Химия. 2005. 46. С. 74.
9. Корсун В.Ф., Ситкевич А.Е., Ефимов В.В. Лечение кожных болезней препаратами растительного происхождения. Минск, 1995.
10. Богдаш А.С. // Тез. докл. Всесоюз. конгр. «Реконструктивно-восстановительные и новые методы лечения в клинике». М., 1989. С. 12.
11. Андреева И.Н. Дис. ... докт. фарм. наук. Пятигорск, 2000.
12. Кузякова Л.М., Шимовонян К.Т. Изучение макро- и микроэлементного состава фитокомпозиций для волос различного типа // Тез. 2-й Всерос. конференции-школы «Высокореакционные интермедиаты химических реакций. ChemInt. 2007. 27-29.08.2007. С. 25

COMPARISON OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE PHOTOCHEMICAL COMPOSITIONS IN THE LIPOSOMAL FORMS

O.A. Umnova

(Russian state university; "Alpika" ltd. Stavropol city)

Synergism actions of the medicinal herbs were learned by non-specific bio-sensor based on *Paramecium caudatum* in the liposomal forms. Using described bio-sensor method allows to select optimal quantitative ratio of biologically active substances produced from the medicinal herbs mighty bactericidal actions.

Key words: *nonspecific biosensor, Paramecium caudatum, liposomal forms, pharmchemistry, biological activity.*

Сведения об авторе: Умнова Оксана Анатольевна – доцент Ставропольского филиала Российского государственного социального университета, канд. эконом. наук, генеральный директор малого инновационного предприятия ООО НПО «Альпика», г. Ставрополь (umnova@alpika.ru).