

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЗЮЗНИКА ЕВРОПЕЙСКОГО ТРАВЫ СВЕЖЕЙ НАСТОЙКИ ГОМЕОПАТИЧЕСКОЙ МАТРИЧНОЙ (*LYCOPUS EUROPAEUS* L.) С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *IN VITRO*

В.И. Зверева

аспирант, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: valentinca1988@mail.ru

Л.Б. Стрелкова

к.б.н., вед. науч. сотрудник, отдел медико-биологических проблем,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

И.А. Лупанова

к.б.н., зам. руководителя Центра медицины,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

О.А. Семкина

к.фарм.н., зав. научно-организационным отделом,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва);
доцент, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (Москва)

Исследована биологическая активность образцов настойки гомеопатической матричной зюзника европейского травы свежей (урожай 2015 и 2016 гг.) в условиях *in vitro* с применением специфических ферментных биотест-систем, основанных на ключевых ферментах антиоксидантной защиты – каталазе и глутатионредуктазе (из биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС) ФГБНУ ВИЛАР). Противовоспалительную активность образцов настойки оценивали *in vitro* по эффективности влияния на ферментную биотест-систему, основанную на индуцибельной NO-синтазе. Выявлены антиоксидантные и противовоспалительные свойства изучаемых образцов настойки гомеопатической матричной зюзника европейского травы свежей. Полученные данные использованы для расширения показаний к применению извлечений из рассматриваемого лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: настойка гомеопатическая матричная зюзника европейского травы свежей, специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, биологическая активность.

Для цитирования: Зверева В.И., Стрелкова Л.Б., Лупанова И.А., Семкина О.А. Исследование биологической активности зюзника европейского травы свежей настойки гомеопатической матричной (*Lycopus europaeus* L.) с применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(10):58–62. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-10-11>

Лекарственное растительное сырье, получаемое из растения зюзник европейский (*Lycopus europaeus* L.), принадлежащее к семейству яснотковые (*Lamiaceae*), находит широкое применение в народной медицине как средство для лечения заболеваний, сопровождающихся высокой температурой; обладает мочегонным и сильным успокаивающим действием, может заменить пустырник и валериану [1], поэтому с успехом применяется для лечения неврозов и расстройств нервной системы, бессонницы. Трава зюзника европейского используется как кровоостанавливающее средство, од-

нако наибольшее распространение получило применение травы зюзника европейского при избыточном образовании гормонов щитовидной железы и её увеличении [2, 3].

Водный настой, спиртовую настойку травы зюзника европейского в народной медицине используют при различных формах тиреотоксикоза, нарушениях ритма сердца, связанных с повышенной функцией щитовидной железы, а также при бессоннице, беспокойстве, беспричинном чувстве страха, возбужденном состоянии при эндокардитах [1].

Настойка гомеопатическая зюзника европейского получила широкое распространение в Германии. На сегодняшний день выпускается целый ряд гомеопатических лекарственных препаратов, как монопрепаратов, так и комплексных, содержащих извлечения из травы зюзника европейского, основное действие которых связано с профилактикой и лечением дисфункций щитовидной железы.

С использованием накопленного опыта европейских стран и США по применению жидких извлечений из травы зюзника европейского, данных маркетингового изучения лекарственных средств, применяемых для профилактики и лечения заболеваний щитовидной железы, зарегистрированных на территории России, а также результатов изучения потребительского мнения как врачей, так и пациентов [4] получена и стандартизована настойка гомеопатическая матричная (НГМ) зюзника европейского травы свежей. Актуальным вопросом для дальнейшего изучения НГМ является определение спектра биологической активности данной настойки.

Для оптимизации выявления биологической активности извлечений из лекарственного растительного сырья целесообразно применение специфических ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro*. Информативность ферментных биотест-систем, разработанных в ФГБНУ ВИЛАР, определяется сродством биологически активных веществ (БАВ) к активным центрам ферментов, играющих ключевую роль в проявлении целевой биологической активности. Используемые в данном исследовании биотест-системы входят в состав биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС) ФГБНУ ВИЛАР.

Цель работы – изучение биологической активности НГМ зюзника европейского травы свежей с применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro*, разработанных на основе ключевых ферментов регуляции гомеостаза организма – глутатионредуктазы, каталазы и индуцибельной NO-синтазы (iNOS) [5–8].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Реактивы: глутатион окисленный, высокоочищенные ферменты – глутатионредуктаза (ГР), каталаза (КАТ), индуцибельная NO-синтаза (iNOS), НАДФН (все реактивы фирмы «Sigma-Aldrich», США); соляная кислота класса «о.с.ч.», фосфат натрия и калия, хлорид калия и магния, перекись водорода.

Объект исследования: НГМ зюзника европейского травы свежей, полученная из зюзника европейского, культивируемого в ФГБНУ ВИЛАР, урожая 2015 г. (образец 1) и 2016 г. (образец 2).

Скорость глутатионредуктазной реакции определяли спектрофотометрически [9] по убыли поглощения при 340 нм за счет окисления НАДФН эквимольным количеством восстановленного глутатиона. Измерения проводили на анализаторе для клинической химии Clima MC-15. Объем пробы 0,5 мл. Исследования осуществляли при 24 °С.

Для определения скорости каталазной реакции использовали метод [10], основанный на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс, то есть измерения вели по убыли перекиси водорода в процессе реакции. Измерения выполняли на анализаторе для клинической химии Clima MC-15. Объем пробы 0,5 мл. Исследования проводили при 24 °С.

Скорость ферментативной реакции, катализируемой iNOS, определяли спектрофотометрическим методом в условиях *in vitro* при 37 °С на спектрофотометре Shimadzu U1800 (Япония) с применением программы кинетических исследований. По изменению поглощения НАДФН при 340 нм находили кинетическую скорость iNOS-реакции до (контроль) и после добавления тестируемых растворов (опыт) в реакционную пробу.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ статистического анализа Statistica 6,0 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование антиоксидантной активности образцов НГМ зюзника европейского травы свежей в условиях *in vitro*. С помощью глутатионредуктазной биотест-системы установлено, что вещества с доказанными адаптогенными и антиоксидантными свойствами активируют глутатионредуктазу в условиях *in vitro*. При наличии у веществ противомикробных свойств наблюдается угнетение глутатионредуктазы.

Тестирование веществ *in vitro* с помощью глутатионредуктазы (ГР) в сочетании с каталазной (КАТ) реакцией позволяет избирательно выявить адаптогены, характерным свойством которых является активация ГР и угнетение КАТ. Антиоксиданты повышают скорость глутатионредуктазной реакции, но не угнетают скорость каталазной реакции [5–7].

Проанализировав результаты проведенного исследования, можно утверждать, что в условиях *in vitro* оба образца НГМ зюзника европейского

травы свежей (урожай 2015 и 2016 гг.) проявляют антиоксидантные свойства, увеличивая скорость ГР- и КАТ-реакций (табл. 1).

Таблица 1. Влияние исследуемых образцов на скорость глутатионредуктазной и каталазной реакций *in vitro*

Вариант опыта	Скорость реакции, $M \pm m$			
	Глутатионредуктаза		Каталаза	
	мкмоль/мин на мг белка	% от контроля	мкмоль/мин на мг белка	% от контроля
Контроль	0,052±0,0019	100	0,090±0,004	100
Образец 1 (10 мкл)	0,120±0,0050*	231	0,157±0,007*	174
Образец 1 (20 мкл)	0,053±0,0019	103	0,207±0,009*	230
Образец 2 (10 мкл)	0,132±0,0054*	254	0,093±0,004	103
Образец 2 (20 мкл)	0,052±0,0024	100	0,204±0,009*	227

Примечание: * – достоверность отличий от контроля при $p < 0,05$.

Оба образца НГМ зюзника европейского травы свежей в концентрации 10 мкл оказывают активирующее влияние на ГР, что свидетельствует о наличии БАВ, близких по строению элементов в структуре биологически активных соединений, обеспечивающих взаимодействие с глутатионредуктазой, которая играет важнейшую роль в антиоксидантной защите тиоловых ферментов. Все образцы оказывают повышающее влияние на скорость КАТ, проявляя, таким образом, антиоксидантные свойства.

Исследование противовоспалительной активности образцов НГМ зюзника европейского травы свежей в условиях *in vitro*. При изучении противовоспалительных свойств образцов НГМ зюзника европейского травы свежей в условиях *in vitro* была использована биотест-система, основанная на ключевом ферменте в развитии воспалительного процесса – индуцибельной NO-синтазе [8]. Для верификации и апробации iNOS биотест-системы с целью выявления противовоспалительных свойств БАВ в фитопрепаратах применяли нестероидные противовоспалительные препараты (НПВС) с установленными противовоспалительным действием – диклофенак, кетонал, мелоксикам и другие. Активирующее действие на фермент противомикробных лекарственных средств подтверждено экспериментально *in vitro* на препаратах с установленным противомикробным действием [8]. В литературе также имеются доказательства активации фермента индуцибельной NO-синтазы под влиянием растительных иммуномодуляторов. Известно, что БАВ, содержащиеся в экстрактах, фракциях, настойках, полученных из

лекарственных растений, обладают как активирующим на iNOS действием (например, производные халконов, тритерпеноиды, тиолсодержащие агенты), так и ингибирующим действием (тионитросоединения, гуанидины, нитроамины, фуросаны). Противомикробные препараты (доксциклин) активируют iNOS. Иммуномодуляторы активируют синтез iNOS макрофагами [9].

При изучении противовоспалительной активности НГМ зюзника европейского травы свежей (урожай 2015 г. и 2016 г.) с помощью ферментной биотест-системы, основанной на индуцибельной NO-синтазе, оценивали влияние БАВ, содержащихся в образце 1 и образце 2, на скорость ферментативной реакции, катализируемой iNOS, в условиях *in vitro*. Результаты оценки противовоспалительной активности образцов зюзника с применением iNOS-тест системы *in vitro*, представлены в табл. 2.

По скорости ферментативной реакции, катализируемой iNOS, оценивали противовоспалительную активность НГМ зюзника европейского травы свежей образца 1 (урожай 2015 г.) в разведениях 1:10, 1:30, 1:100. В результате были установлены различия в каталитической активности iNOS-фермента в присутствии исследованных растворов, приготовленных в разных разведениях. Как видно из результатов, приведенных в табл. 2, каталитическая активность iNOS снижается в ряду разведений 1:100 > 1:10 > 1:30. В реакционную пробу добавляли к тест-ферменту 20 мкл из разведений образца 1, в результате при разведении 1:100, скорость iNOS-реакции ингибировалась, соответственно, на 34% по сравнению с контролем, а

в разведении 1:10 только на 16%. В отличие от этого при разведении 1:30, кинетическая скорость iNOS-реакции возростала, примерно, в 1,5 раза. Вероятно, настойка зюзника европейского травы

свежей (образец 1) содержит как ингибиторы тест-фермента (противовоспалительные БАВ), так и активаторы, к которым можно отнести БАВ, обладающие иммуномодулирующими свойствами.

Таблица 2. Влияние исследуемых образцов настойки на кинетическую скорость ферментативной реакции, катализируемую iNOS *in vitro*

Вариант опыта (концентрация препарата в пробе 13,3 мкг/мл)	Скорость ферментативной реакции, катализируемая iNOS, в условиях <i>in vitro</i>	
	нмоль НАДФН / мг ф-та*мин	% от контроля
Контроль (без препарата)	1,688±0,036	100
Настойка (образец 1) Разведение 1:10	1,417±0,068	84
Настойка (образец 1) Разведение 1:30	2,462 ±0,060	146
Настойка (образец 1) Разведение 1:100	1,113±0,042	66
Настойка (образец 2) Разведение 1:10	0,930 ±0,065	55
Настойка (образец 2) Разведение 1:30	1,295 ±0,064	77
Настойка (образец 2) Разведение 1:100	1,052±0,046	62

В отличие от образца 1, БАВ, содержащиеся в образце 2 (урожай 2016 г.), при разведении в соотношении 1:10, 1:30 и 1:100 эффективно ингибировали iNOS-реакцию в условиях *in vitro*. При этом скорость ферментативной реакции, катализируемая iNOS, снижалась по сравнению с контролем соответственно на 45, 38 и 23%. Полученные данные свидетельствуют об эффективном ингибирующем влиянии БАВ в настойке образца 2 в разведениях 1:10 > 1:100 > 1:30.

В условиях *in vitro* оба образца НГМ зюзника европейского травы свежей (урожай 2015 и 2016 гг.) проявляют антиоксидантные и противовоспалительные свойства. В тоже время установлены некоторые различия в активности образца 1 и образца 2, собранных в 2015 и 2016 гг. Полученные результаты можно объяснить различием в содержании БАВ, обладающих противовоспалительной активностью.

Выводы

1. В результате проведенных исследований с использованием специфичных ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro* установлено, что образцы НГМ зюзника европейского травы свежей (урожай 2015 и 2016 гг.) обладают антиоксидантной и противовоспалительной активностью.
2. Результаты исследования подтверждают перспективность создания новых лекарственных

средств на основе лекарственного растительного сырья зюзника европейского.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лавренов В.К., Лавренова Г.В. Энциклопедия лекарственных растений народной медицины. СПб: Издательский дом «Нева». 2003. 87 с.
2. Кьосев П.А. Полный справочник лекарственных растений. М.: ЭКСМО. 2011. 551 с.
3. Ферубко Е.В., Багинская А.И., Лескова Т.Е. и др. Зюзник европейский (краткий обзор) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2012. № 1. С. 185–189.
4. Зверева В.И., Семкина О.А., Грибкова Е.И. и др. Обоснование целесообразности использования экстракта травы зюзника европейского с целью разработки пероральных лекарственных форм // Сб. науч. трудов Второй научно-практич. конф. «Молодые ученые и фармация XXI века». М.: ФГБНУ ВИЛАР. 2014. С. 256–261.
5. Патент № 2181890 (РФ). Способ выявления веществ, обладающих адаптогенными свойствами, *in vitro* / В.А. Быков, В.А. Дубинская, М.Ф. Минеева, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир. 2001 г.
6. Патент № 2181891 (РФ). Способ выявления веществ, обладающих противомикробными и противовирусными свойствами, *in vitro*. / В.А. Быков, В.А. Дубинская, М.Ф. Минеева, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир. 2001 г.
7. Патент № 2181892 (РФ). Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, *in vitro* / В.А. Быков, В.А. Дубинская, М.Ф. Минеева, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир. 2002 г.
8. Стрелкова Л.Б., Кондакова Н.В., Дубинская В.А. и др. Индуцибельная NO-синтаза как ферментная биотест-система для выявления веществ с противовоспалительными свойствами *in vitro* // Вопросы биологической,

- медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 11. С. 75–80.
9. Aebi. H. Glutathione reductase // Methods in enzymatic analysis. 1974. P. 673–678.
10. Королюк М.А., Иванова М.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 1–8.

Поступила 13 августа 2018 г.

THE STUDY OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF *LYCOPUS EUROPAEUS* FRESH HERB TINCTURE HOMEOPATHIC MATRIX WITH THE APPLICATION OF SPECIFIC ENZYME BIOTEST SYSTEMS *IN VITRO* EXPERIENCE

© Authors, 2018

V.I. Zvereva

Post-graduate Student, All-Russian Scientific Research of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: valentinca1988@mail.ru

L.B. Strelkova

Ph.D. (Biol.), Leading Research Scientist, Department of Biomedical Problems, All-Russian Scientific Research of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

I.A. Lupanova

Ph.D. (Biol.), Deputy of the Head of the Center of Medicine, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

O.A. Semkina

Ph.D. (Pharm.), Leading Research Scientist, All-Russian Scientific Research of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow); Associate Professor, Lomonosov Moscow State University (Moscow)

The article deals with the study of the biological activity of samples of tincture homeopathic matrix *Lycopus europaeus* L. fresh herb (collection of 2015 and 2016) *in vitro* using a specific enzyme bioassay systems based on the key antioxidant enzymes – catalase and glutathionereductase. Anti-inflammatory activity of the tincture samples was evaluated *in vitro* by the effect on the enzyme Biotest system based on inducible NO-synthase. Revealed antioxidant and anti-inflammatory properties in the studied samples of tincture homeopathic matrix *Lycopus europaeus* L. fresh herb. The obtained data were used to expand the indications for the use of extracts from this medicinal plant material. In this study we used biotest-systems from the biological collection of specific enzyme biotest-systems *in vitro* (BK-SFBTS) FGBNU VILAR.

Key words: *Lycopus europaeus* fresh herbs tincture homeopathic matrix, specific enzyme biotest-system *in vitro*, biological activity.

For citation: The study of the biological activity of *Lycopus europaeus* fresh herb tincture homeopathic matrix with the application of specific enzyme biotest systems *in vitro* experience. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(10):58–62. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-10-11>

REFERENCES

1. Lavrenov V.K., Lavrenova G.V. Enciklopediya lekarstvennyh rastenij narodnoj mediciny. SPb: Izdatel'skij dom «Neva». 2003. 87 s.
2. K'osev P.A. Polnyj spravochnik lekarstvennyh rastenij. M.: EKSMO. 2011. 551 s.
3. Ferubko E.V., Baginskaya A.I., Leskova T.E. i dr. Zyzunik evropejskij (kratkij obzor) // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2012. № 1. S. 185–189.
4. Zvereva V.I., Semkina O.A., Gribkova E.I. i dr. Obosnovanie celesobraznosti ispol'zovaniya ekstrakta travy zyzunika evropejskogo s cel'yu razrabotki peroral'nyh lekarstvennyh form // Sb. nauch. trudov vtoroj nauchno-praktich. konf. «Molodye uchenye i farmaciya XXI veka». M.: FGBNU VILAR. 2014. S. 256–261.
5. Patent № 2181890. Sposob vyyavleniya veshchestv, obladayushchih adaptogennymi svojstvami, *in vitro* / V.A. Bykov, V.A. Dubinskaya, M.F. Mineeva, L.B. Rebrov, V.K. Kolhir. 2001 g.
6. Patent № 2181891. Sposob vyyavleniya veshchestv, obladayushchih protivomikrobnymi i protivovirusnymi svojstvami, *in vitro*. / V.A. Bykov, V.A. Dubinskaya, M.F. Mineeva, L.B. Rebrov, V.K. Kolhir. 2001 g.
7. Patent RF № 2181892. Sposob vyyavleniya veshchestv, obladayushchih antioksidantnymi svojstvami, *in vitro* / V.A. Bykov, V.A. Dubinskaya, M.F. Mineeva, L.B. Rebrov, V.K. Kolhir. 2002 g.
8. Strelkova L.B., Kondakova N.V., Dubinskaya V.A. i dr. Inducibel'naya NO-sintaza kak fermentnaya biotest-sistema dlya vyyavleniya veshchestv s protivovospalitel'nymi svojstvami *in vitro* // Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii. 2013. № 11. S. 75–80.
9. Aebi. H. Glutathione reductase // Methods in enzymatic analysis. 1974. P. 673–678.
10. Korolyuk M.A., Ivanova M.I., Majorova I.G. i dr. Metod opredeleniya aktivnosti katalazy // Laboratornoe delo. 1988. № 1. С. 1–8.