

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУХОГО ЭКСТРАКТА ТРАВЫ ВОЛОДУШКИ ЗОЛОТИСТОЙ (*BUBLEURUM AUREUM* L.) С ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

И.А. Лупанова

к.б.н, зам. руководителя Центра медицины,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: iriss86@mail.ru

Л.Б. Стрелкова

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

Е.Н. Курманова

науч. сотрудник, отдел экспериментальной и клинической фармакологии,
Центр медицины, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

М.А. Джавахян

к.фарм.н., зав. отделом фармацевтической технологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Изучены адаптогенные, противомикробные, антиоксидантные и противовоспалительные свойства сухого экстракта травы володушки золотистой (*Bubleurum aureum* L.) с применением ключевых ферментов антиоксидантной защиты: каталазы и глутатионредуктазы, а также ферментных биотест-систем на основе индуцибельной NO-синтазы и ксантинооксидазы, играющих ключевую роль в развитии воспалительного процесса. Установлено слабовыраженное противомикробное действие и достоверная противовоспалительная активность биологически активных веществ исследованного экстракта.

Ключевые слова: володушки золотистой травы экстракт сухой, биологическая активность, специфические ферментные биотест-системы.

В последние годы для лечения широкого спектра заболеваний все чаще стали применяться препараты растительного происхождения. В отличие от синтетических, фитопрепараты обладают малой токсичностью и лучшей переносимостью, проявляя при этом заметную фармакологическую активность, что позволяет гораздо шире использовать фитопрепараты для симптоматического, профилактического и восстановительного лечения, а также противорецидивной терапии. В связи с этим разработка и внедрение новых эффективных и безопасных лекарственных препаратов из растительного сырья является актуальной задачей современной фармакологии.

Перспективным объектом для создания фитопрепаратов являются произрастающие на территории Российской Федерации растения рода Володушка (*Vupleurum*). Они активно используются в народной медицине. Особый интерес представляет трава володушки золотистой (*Vupleurum aureum*

Fisch. Hoffm.), которая обладает желчегонной, антисептической, противовоспалительной, ранозаживляющей, жаропонижающей, тонизирующей активностью, а также оказывает общеукрепляющее действие и способствует улучшению обменных процессов. Наружно володушка золотистая применяется при заболеваниях глаз и гнойничковых заболеваниях кожи [1].

Во Всероссийском научно-исследовательском институте лекарственных и ароматических растений (ФГБНУ ВИЛАР) разработан и стандартизирован экстракт володушки золотистой травы экстракт сухой. Присутствие в экстракте володушки золотистой флавоноидов, дубильных веществ обычно связывают с противовоспалительной активностью, а наличие алкалоидов может способствовать антимикробному действию.

Для проведения скрининга биологически активных веществ (БАВ) лекарственных растений, оценки специфической фармакологической актив-

ности БАВ, содержащихся в экстрактах, фракциях, субстанциях из растительного и биотехнологического сырья, в ФГБНУ ВИЛАР используются специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, проявляющие высокую избирательность к веществам с искомой фармакологической активностью [2]. Исследованные в данной работе ферментные биотест-системы входят в состав Биологической Коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК СФБТС) ФГБНУ ВИЛАР. В настоящее время разработаны и запатентованы оригинальные биотест-системы на основе ферментов антиоксидантной защиты (каталазы, глутатионредуктазы), иммунной системы (НАДФН-оксидазы), ферментов биотрансформации – системы цитохрома P₄₅₀ и глутатионтрансферазы [3]. Новизну представляют верифицированные ферментные биотест-системы, разработанные на основе индуцибельной NO-синтазы и ксантиноксидазы (КО), играющих ключевую роль в развитии воспалительного процесса [4, 5]. Оригинальные биотест-системы ФГБНУ ВИЛАР обладают высокой избирательностью, информативностью, чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, быстротой достижения результатов, позволяют оптимизировать доклинические исследования.

Ц е л ь р а б о т ы – изучение с помощью ферментных биотест-систем *in vitro* биологически активных свойств экстракта травы володушки золотистой (*B. aureum* L.).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил образец сухого экстракта травы володушки золотистой, разработанный и стандартизированный в ФГБНУ ВИЛАР. В составе экстракта содержатся флавоноиды, сапонины, полисахариды, дубильные вещества катехиновой природы. Содержание фенольных соединений в пересчете на рутин составляет $8,0 \pm 0,5\%$ [6].

В исследовании использовали следующие реактивы: глутатион окисленный, высокоочищенные ферменты глутатионредуктаза (ГР) и каталаза (КАТ), коммерческие ферментные препараты – индуцибельная NO-синтаза (iNOS) из мышинных макрофагов, экспрессированных *E. coli*, в буферном растворе 50 мМ HEPES pH 7,4 с 1 мМ ацетатом магния и 10%-ным глицерином («Sigma-Aldrich», США), лиофилизированная микробная ксантиноксидаза («Sigma», Япония), магний ацетат,

6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптерин (ДМТП), дитиотреитол (ДТТ), диметилсульфоксид (ДМСО)-реактивы («Sigma-Aldrich», США); N-(гидроксиэтил) пиперазин-2-этансульфоновая кислота (HEPES), L-аргинин, оксигемоглобин – реактивы фирмы «GERBU» (Германия), ксантин («Fluka»), мочевиная кислота («Sigma»). Соляная кислота марки о.с.ч., фосфат натрия и калия, хлорид калия и магния, перекись водорода – отечественные реактивы.

В экспериментах *in vitro* скорость ферментных ГР- и КАТ-реакций измеряли спектрофотометрически на биохимическом анализаторе Clima CM-15 (Испания). Скорость ГР-реакции определяли по разности оптической плотности растворов при 340 нм за счет окисления НАДФН, эквивалентно восстановлению окисленного глутатиона [7]; скорость КАТ-реакции – по цветной реакции комплекса перекиси водорода с молибдатом аммония при 410 нм [8]. Для сравнительной оценки непосредственного действия веществ на протекающие ферментных реакций использовали скорости реакций, полученные при оптимальных концентрациях изучаемых веществ (3,3 и 6,6 мкг/мл).

Противовоспалительную активность володушки золотистой оценивали по ингибирующему влиянию БАВ на ферментативную реакцию, катализируемую iNOS, в условиях *in vitro*. Скорость iNOS-реакции определяли спектрофотометрически при 37 °С в режиме кинетических исследований [3]. Контролировали оптическое поглощение реакционной пробы при 340 нм в течение 1–3 мин на двулучевом спектрофотометре «Шимадзу UV-1800» (Япония). Измерения проводили до и после добавления в пробу экстракта в интервале концентраций 26,7–0,07 мкг/мл. Исследовали ферментативную активность ксантиноксидазы в условиях *in vitro* [4] до и после добавления к ферменту КО экстракта володушки золотистой в оптимальной концентрации 62,5 мкг/мл. В ходе реакции контролировали окисление ксантина до мочевиной кислоты. Измерения оптической плотности производили при 296 нм на спектрофотометре «Шимадзу UV-1800» (Япония).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ статистического анализа Statistica 6,0 («StatSoft», США). Для оценки значимости отличий между выборками с распределением, приближающимся к нормальному, использовался *t*-критерий Стьюдена

та [9]. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Данные в тексте и таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая величина, m – ошибка средней арифметической.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования биологической активности сухого экстракта травы володушки золотистой в условиях опытов *in vitro* были использованы специфичные ферментные биотест-системы – каталазная, глутатионредуктазная, iNO-синтазная и ксантинооксидазная.

Применяли каталазную и глутатионредуктазную специфические биотест-системы для выявления биологической активности при оптимальных концентрациях экстракта володушки золотистой 3,3 и 6,6 мкг/мл соответственно в условиях опытов *in vitro*. Как было доказано ранее [10], БАВ адаптивной направленности избирательно повышают скорость ГР-реакции и снижают скорость КАТ-реакции *in vitro*; БАВ-антиоксиданты активируют скорость ГР- и КАТ-реакций [11]; БАВ противомикробного действия ингибируют скорость ГР- и КАТ-реакций [12]. Растворы изучаемых образцов в

интервале концентраций 1,5–50 мкг/мл добавляли в опытную пробу после внесения ферментов. Предварительно определяли форму зависимости скорости реакции от концентрации вещества в пробе. Установлено, что зависимость скорости ферментативных реакций *in vitro* от концентрации изучаемых веществ описывается кривой с максимумом, который соответствует оптимальной концентрации образца в пробе. Поэтому для сравнительной оценки непосредственного действия веществ на протекание ферментных реакций использовали скорости реакций, полученные при оптимальных концентрациях изучаемых образцов (3,3 и 6,6 мкг/мл).

Из результатов исследования, представленных в табл. 1., видно, что экстракт володушки золотистой в концентрации 6,6 мкг/мл незначительно ингибирует ГТ- и КТ-реакции в опытах *in vitro*, однако в концентрации 3,3 мкг/мл скорость КАТ-реакции в отличие от ГТ-реакции достоверно снижается на 9,7%. Следовательно, сухой экстракт травы володушки золотистой оказывает слабовыраженное противомикробное действие, что может свидетельствовать о низкой специфичности БАВ экстракта володушки золотистой к тест-ферментам (ГР и КАТ) [11].

Таблица 1. Результаты влияния экстракта травы володушки золотистой на скорость глутатионредуктазной, каталазной реакций *in vitro*

Вариант опыта (концентрация экстракта володушки золотистой)	Скорость реакции, $M \pm m$			
	Глутатионредуктазная		Каталазная	
	мкмоль/(мин×мг белка)	%	мкмоль/(мин×мг белка)	%
Контроль	0,260±0,0006	100	0,072±0,005	100
3,3 мкг/мл	0,247±0,001	95	0,065±0,01*	90,3
6,6 мкг/мл	0,249±0,0005	95,8	0,071±0,0001	98,6

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

Ранее при верификации специфичных ферментных биотест-систем на основе индуцибельной NO-синтазы и ксантинооксидазы было выявлено ингибирующее действие лекарственных препаратов с установленными противовоспалительными свойствами (мелоксикам, диклофенак, нимесулид) на ферментативную активность iNOS- и КО-реакций в условиях *in vitro*. Установлено активирующее влияние противомикробных и иммуномодулирующих препаратов на скорость iNOS- и КО-реакций *in vitro* [3, 4].

В экспериментах *in vitro* оценивали ферментативную активность iNOS при снижении концен-

трации экстракта володушки золотистой в реакционной пробе в интервале от 26,7 до 0,07 мкг/мл. Полученные результаты представлены в табл. 2, откуда следует, что в концентрации 13,3 мкг/мл экстракт володушки достоверно ингибирует iNOS-реакцию, при этом каталитическая скорость iNOS-реакции снижается на 33% по сравнению с контролем, что свидетельствует о наличии в экстракте БАВ с противовоспалительной активностью. В концентрациях 0,7 и 0,07 мкг/мл экстракт володушки золотистой существенно увеличивает скорость iNOS-реакции соответственно на 63 и 39%, что указывает на активацию фермента iNOS ак-

тивными веществами, содержащимися в экстракте. Такой эффект, как известно, могут оказывать БАВ с выраженными иммуностимулирующими свойствами. Следовательно, по результатам, полученным с применением iNOS биотест-системы, можно сделать заключение о наличии в экстракте володушки золотистой как противовоспалительных, так и иммуностимулирующих свойств.

Таблица 2. Результаты влияния экстракта травы володушки золотистой на скорость ферментативной реакции, катализируемую iNOS in vitro

Вариант опыта (концентрация экстракта володушки золотистой)	Скорость реакции НАДФН	
	мкмоль/(мин×мг белка)	%
Контроль	3,92±0,03	100
26,7 мкг/мл	3,73±0,03	95
20,0 мкг/мл	4,07±0,02	101
13,3 мкг/мл	2,64 ±0,01*	67
6,7 мкг/мл	4,17±0,04	105
0,7 мкг/мл	6,08±0,04*	163
0,07 мкг/мл	4,18±0,03*	139

Примечание: * – см. табл. 1.

Оценивали влияние БАВ на ферментативную активность ксантиноксидазы *in vitro*. Изменение активности КО контролировали по скорости окисления ксантина до мочевого кислоты при оптимальной концентрации экстракта володушки золотистой в опытной пробе 62,5 мкг/мл. В результате проведенного исследования было установлено достоверное снижение скорости КО-реакции на 15% по сравнению с контролем, что свидетельствует об ингибирующем противовоспалительном эффекте БАВ володушки золотистой на активность ксантиноксидазы в условии *in vitro*.

Выводы

1. Биологическая активность сухого экстракта травы володушки золотистой исследована в условиях опытов *in vitro* с применением специфичных каталазной, глутатионредуктазной,

iNO-синтазной и ксантиноксидазной ферментных биотест-систем.

2. В условиях каталазной и глутатионредуктазной тест-систем установлено слабовыраженное противомикробное действие экстракта володушки золотистой, что может свидетельствовать о низкой специфичности БАВ экстракта к тест-ферментам каталазе и глутатионредуктазе.
3. По ингибирующему влиянию экстракта володушки золотистой (*Bupleurum aureum* L.) в концентрации 13,3 мкг/мл на ферментативную активность специфичных тест-ферментов iNO-синтазы и ксантиноксидазы достоверно установлена противовоспалительная активность БАВ исследованного экстракта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буданцев А.Л., Лесиовская Е.Е. Дикорастущие полезные растения России. СПб. 2001. 663 с.
2. Лупанова И.А., Стрелкова Л.Б., Ферубко Е.В. Колхир В.К. Биотестирование в экспериментальной фармакологии: применение специфических ферментных биотест-систем *in vitro* // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2013. № 1. С. 37–40.
3. Стрелкова Л.Б., Минеева М.Ф., Багинская А.И., Леонидова Ю.А., Колхир В.К., Ребров Л.Б., Климахин Г.И., Быков В.А. Растительные масла как перспективные объекты для разработки антиоксидантных препаратов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2008. № 3. С. 10–13.
4. Стрелкова Л.Б., Кондакова Н.В., Дубинская В.А., Быков В.А. Индуцибельная NO-синтаза как ферментная биотест-система для выявления веществ с противовоспалительными свойствами *in vitro* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 1. С. 75–80.
5. Кондакова Н.В., Стрелкова Л.Б., Дубинская В.А., Быков В.А. Ксантиноксидаза как ферментная биотест-система для выявления *in vitro* биологически активных веществ с противовоспалительными и противоартритными свойствами // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 11. С. 81–85.
6. Канунникова Ю.С. Фармакогностическое изучение и стандартизация травы и экстракта сухого володушки золотистой (*Bupleurum aureum* L.): Автореф. ... дис. канд. техн. наук. М.: ФГБНУ ВИЛАР. 2014. 21 с.
7. Aebi H. Glutathione reductase / Methods in enzymatic analysis. H.V. Bergmeyer (red.). 1974. № 2. P. 673–678.
8. Королюк М.А., Иванова М.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 1–8.
9. Хабриев П.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: ОАО «Издательство «Медицина». 2005. 832 с.

10. Патент № 2181890 (РФ). Способ выявления веществ, обладающих адаптогенными свойствами, *in vitro* / В.А. Быков, М.Ф. Mineeva, В.А. Дубинская, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир.
11. Патент № 2181892 (РФ). Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, *in vitro* / В.А. Быков, В.А. Дубинская, М.Ф. Mineeva, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир.
12. Патент № 2181891 (РФ). Способ выявления веществ, обладающих противомикробными и противовирусными свойствами, *in vitro* / В.А. Быков, М.Ф. Mineeva, В.А. Дубинская, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир.

Поступила 3 апреля 2017 г.

THE STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE DRY EXTRACT OF GOLDEN THOROUGHWAX (*BUBLEURUM AUREUM* L.) GRASS USING SPECIFIC ENZYMATIC TEST SYSTEMS *IN VITRO*

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)
E-mail: iriss86@mail.ru

B.L. Strelkova

Ph.D. (Med.), Leader Research Scientist, Department of Biomedical Technologies of Biopolymers of Plant and Animal Cells,
Center of Medicine, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E.N. Kurmanova

Research Scientist, Department of Experimental and Clinical Pharmacology,
All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

M.A. Javakhian

Ph.D., (Pharm.), Head of Department of Pharmaceutical Technology,
All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

In this work the extract of Golden Thoroughwax grass (*Bupleurum aureum* L.) was used how the object of investigations. To study the biologically active properties the specific enzyme biotest-systems *in vitro* glutathione reductase- and catalase-base as well as NO-synthase and xanthine oxidase-base were applied. Direct influence studied substances on enzymes glutathione reductase (GR), catalase (CAT), NO-synthase and xanthine oxidase playing a regulatory role in adaptation processes was defined. Compounds with antioxidant, antimicrobial, adaptogenic and anti-inflammatory activity can be detected using complex of these specific enzyme bio-test systems. It was found mean antimicrobial characteristics and the anti-inflammatory activity of biologically active substances contained in a dry extract of Golden Thoroughwax (*Bupleurum aureum* L.).

Key words: dry extract of Golden Thoroughwax (*Bupleurum aureum* L.), biological activity, specific enzyme bio-test systems.

REFERENCES

1. Budancev A.L., Lesiovskaja E.E. Dikorastushhie poleznye rastenija Rossii. Spb. 2001. 663 s.
2. Lupanova I.A., Strelkova L.B., Ferubko E.V., Kolhir V.K. Biotestirovanie v jeksperimental'noj farmakologii: primenenie specificheskikh fermentnyh biotest-sistem *in vitro* // Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya. 2013. № 1. S. 37–40.
3. Strelkova L.B., Mineeva M.F., Baginskaja A.I., Leonidova Ju.A., Kolhir V.K., Rebrov L.B., Klimahin G.I., Bykov V.A. Rastitel'nye masla kak perspektivnye ob#ekty dlja razrabotki antitoksicheskikh preparatov // Voprosy biologicheskoi, medicinskoj i farmacevticheskoi himii. 2008. № 3. S. 10–13.
4. Strelkova L.B., Kondakova N.V., Dubinskaja VA., Bykov V.A. Inducibel'naja NO-sintaza kak fermentnaja biotest-sistema dlja vyjavlenija veshhestv s protivovospalitel'nymi svojstvami *in vitro* // Voprosy biologicheskoi, medicinskoj i farmacevticheskoi himii. 2013. № 1. S. 75–80.
5. Kondakova N.V., Strelkova L.B., Dubinskaja, V.A., Bykov V.A. Ksantinoksidaza kak fermentnaja biotest-sistema dlja vyjavlenija *in vitro* biologicheskii aktivnyh veshhestv s protivovospalitel'nymi i protivoartritnymi svojstvami // Voprosy biologicheskoi medicinskoj i farmacevticheskoi himii. 2013. № 11. S. 81–85.
6. Kanunnikova Ju.S. Farmakognosticheskoe izuchenie i standartizacija travy i jekstrakta suhogo volodushki zolotistoj (*Bupleurum aureum* L.): Avtoref. ... dis. kand. tehn. nauk. M.: FGBNU VILAR. 2014. 21 s.
7. Aebi H. Glutathione reductase / Methods in enzymatic analysis. H.V. Bergmeyer (red.). 1974. № 2. P. 673–678.
8. Koroljuk M.A., Ivanova M.I., Majorova I.G., Tokarev V.E. Metod opredelenija aktivnosti katalazy // Laboratornoe delo. 1988. № 1. S. 1–8.
9. Habriev R.U. Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv. Izd. 2-e, pererab. i dop. M.: OAO «Izdatel'stvo «Medicina». 2005. 832 s.
10. Patent № 2181890 (RF). Sposob vyjavlenija veshhestv, obladajushchih adaptogennymi svojstvami, *in vitro* / V.A. Bykov, M.F. Mineeva, V.A. Dubinskaja, L.B. Rebrov, V.K. Kolhir.
11. Patent № 2181892 (RF). Sposob vyjavlenija veshhestv, obladajushchih antioksidantnymi svojstvami, *in vitro* / V.A. Bykov, V.A. Dubinskaja, M.F. Mineeva, L.B. Rebrov, V.K. Kolhir.
12. Patent № 2181891 (RF). Sposob vyjavlenija veshhestv, obladajushchih protivomikrobnymi i protivovirusnymi svojstvami, *in vitro* / V.A. Bykov, M.F. Mineeva, V.A. Dubinskaja, L.B. Rebrov, V.K. Kolhir.