

Оценка биологической активности растительных экстрактов по показателю LC50 в экспериментах in vitro на примере экстрактов Таволги, Белокопытника и Зюзьника*ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского Минздрава России, кафедра общей биологии, фармакогнозии и ботаники**Научный руководитель: д.б.н. Полуконова Н.В.***Резюме**

Оценена биологическая активность трех экстрактов: цветков Таволги вязолистной, листьев Белокопытника гибридного и травы Зюзьника европейского при разных концентрациях на культуре клеток SPEV-2 по такому показателю, как LC50, позволяющем выявлять пробиты мертвых клеток в эксперименте. Выявленные зависимости концентрация-эффект являются линейными. Полулетальные концентрации водных растворов экстрактов, полученные пробит-анализом, методом выявления количества мертвых клеток при разных концентрациях, составила для цветков Таволги 0,9 мг/мл, листьев Белокопытника – 4,9 мг/мл и травы Зюзьника – 4,4 мг/мл. В отношении клеток в культуре в эксперименте in vitro понятие LD₅₀ может быть принято условно, т.к. за сутки может происходить увеличение количества клеток путем их деления, в результате количество клеток к концу эксперимента может оказаться больше, чем в начале эксперимента. По нашему мнению, показатель LD₅₀ может быть удобен для сравнительной экспресс-оценки биологической активности растительных экстрактов.

Ключевые слова: растительные экстракты, Таволга вязолистная, Белокопытник гибридный, Зюзьник европейский, SPEV-2**Введение**

В настоящее время существуют разные методы оценки биологической активности растительных экстрактов (Умнова, 2010; Викуль, 2012; Габрук и др., 2012; Наволокин и др., 2013; Георгиянц, Владимирова, 2013; Наволокин и др., 2013; Курчатова и др., 2014; Наволокин и др., 2015, 2016; Полуконова и др., 2016 и др.). Проведенные ранее исследования противоопухолевой активности растительных экстрактов в экспериментах in vitro с использованием разных клеточных культур (Полуконова и др., 2013; Наволокин и др., 2014; Андреева и др., 2016; Байтман и др., 2016) определили необходимость выбора единых критериев оценки активности экстрактов разных растений.

Цель исследования: сравнить биологическую активность растительных экстрактов Таволги вязолистной (*Filipendula ulmaria*), Белокопытника гибридного (*Petasites hybridus*) и Зюзьника европейского (*Lycopus europaeus*) в экспериментах in vitro на культуре клеток SPEV-2 с использованием показателя LC50.

Материал и методы

Использованы водные растворы флавоноидсодержащих экстрактов цветков Таволги, листьев Белокопытника и травы Зюзьника, полученные определенным способом, позволяющим получить нетоксичный экстракт даже из ядовитого растительного сырья (Патент на изобретение RUS 2482863; Navolokin et al., 2012; Полуконова и др., 2013; Polukonova et al., 2014).

Подлинность экстрактов подтверждалась качественными реакциями с кристаллическим магнием и реактивом Вагнера – Бушарда, результаты которых свидетельствуют о наличии флавоноидов и отсутствии алкалоидов в полученных экстрактах.

Культивирование клеток почеч эмбриона свиньи (SPEV-2) проводили в среде RPMI-4 в 96 луночных планшетах. Анализировали следующие концентрации экстрактов: 30 мг/мл; 15 мг/мл; 7,5 мг/мл; 3,8 мг/мл; 1,9 мг/мл; 0,9 мг/мл. Контролем служили клетки в питательной среде без добавления экстракта.

В качестве красителей использовали йодистый пропидий и акридиновый оранжевый.

Фотосъемку проводили с использованием нескольких режимов регистрации светорассеяния и флуоресценции (на световом микроскопе Leica DM 2500, конфокальном микроскопе Leica LSM SP – 5).

Перевод процента погибших клеток в пробиты проводили согласно руководству Коросова, Калинкиной (2003).

Работа проведена на базе ЦКП Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов.

Результаты и обсуждение

Нами оценена биологическая активность трех экстрактов: цветков Таволги, листьев Белокопытника и травы Зюзьника при разных концентрациях на культуре клеток SPEV-2 по такому показателю, как LC50, позволяющем выявлять пробиты мертвых клеток в эксперименте. Выявленные зависимости концентрация-эффект являются линейными (рисунок 1). Полулетальные концентрации водных растворов экстрактов, полученные пробит-анализом методом выявления количества мертвых клеток при разных концентрациях, составила для цветков Таволги 0,9 мг/мл, листьев Белокопытника – 4,9 мг/мл и травы Зюзьника – 4,4 мг/мл.

Наиболее активен в отношении клеток SPEV-2 оказался экстракт Таволги.

Как известно, LD₅₀ — средняя концентрация вещества, вызывающая гибель половины членов испытываемой группы в течение суток. При этом, предполагается, что исследуемый объект находится в нормальных условиях, без приёма каких-либо специальных мер предосторожности или, наоборот, усугубляющих факторов. В отношении клеток в культуре в эксперименте in vitro понятие LD₅₀ может быть принято условно, т.к. за сутки может происходить увеличение количества клеток путем их деления, в результате количество клеток к концу эксперимента может оказаться больше, чем в начале эксперимента. Тем не менее, по-нашему мнению, такой показатель, как LD₅₀ может быть удобен для сравнительной экспресс-оценки биологической активности растительных экстрактов.

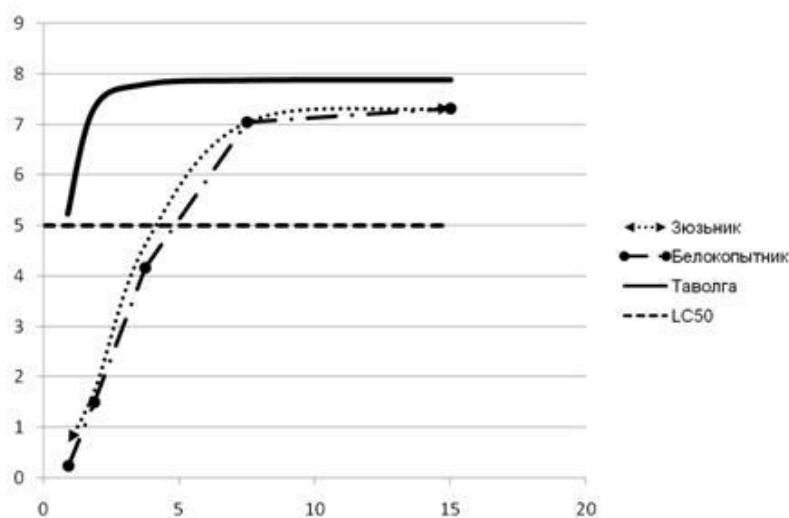


Рисунок 1. Зависимость % погибших клеток (в пробитах) от концентраций двух экстрактов А - Таволги, Б – Белокопытника, В - Зюзьника (определение LC₅₀). По вертикали указаны пробиты, по горизонтали – значения концентраций

Литература

1. Андреева А. А., Гелевера Н.И., Шаркова Е. А, Полуконова А.В., Прилепский А.Ю., Полуконова Н.В. Сравнение активности экстрактов Кирказона ломоносовидного (*Aristolóchiaclematítis*) и Кипрея узколистного (*Chamérionangustifolium*) на культуру клеток SPEV-2 // Саратовский медицинский журнал. 2016. Т.12 №2. С. 226.
2. Байтман Т.П., Полуконова А.В., Прилепский А.Ю. Исследование действия растительных экстрактов на морфологические изменения в культуре клеток SPEV-2 // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2016. Т. 6. 5. С. 891.
3. Викуль С.И. Биологическая активность растительного сырья – ингредиента пищевых продуктов // Харчова наука і технологія. 2012. №4(21). С. 40-44.
4. Габрук Н.Г., Ле Ван Тхуан, Олейникова И.И. Определение интегральной антиоксидантной активности различных экстрактов имбиря с помощью электрохимического детектирования // Научные ведомости. Серия Естественные науки. 2012. №9 (128). Вып. 19. С. 159-162.
5. Георгиянц В. А., Владимирова И. Н. Масс-спектрометрическое определение биологически активных соединений зюзника европейского // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2013. Выпуск № 25 (168). Т. 24. С. 213-215.
6. Коросов А.В., Калинин Н.М. Количественные методы экологической токсикологии. Учебно-методическое пособие. Петрозаводск: ПетрГУ, КНЦ, 2003. 56 с.
7. Курчатова М.Н., Дурнова Н.А., Полуконова Н.В. Влияние экстрактов, содержащих биофлавоноиды, на индукцию микроядер диоксидином в эритроцитах крови беспородных белых мышей // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2014 а. № 2. С. 58-65.
8. Курчатова М.Н., Полуконова Н.В., Дурнова Н.А. Определение класса токсичности экстракта *Gratiola officinalis* L., с использованием нового тест-объекта – личинки *Chironomus giragius* // Токсикологический вестник. 2014 б. № 6. С. 40-43.
9. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Скворцова В.В., Байтман Т.П., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. Противоопухолевая активность растительных экстрактов, содержащих биофлавоноиды // Российский биотерапевтический журнал. 2013. Т. 12. № 2. С. 59-59а.
10. Наволокин Н.А., Полуконова А.В., Бибикова О.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б. Цитоморфологические изменения в культуре клеток почки эмбриона свиньи при воздействии экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) // Фундаментальные исследования. 2014. № 10-7. С. 1369-1374.
11. Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Матвеева О.В., Тычина С.А., Бучарская А.Б., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н. Влияние растительных экстрактов, содержащих флавоноиды, на лейкоцитарную формулу и красный костный мозг лабораторных крыс с перевитой саркомой 45 // Успехи современного естествознания. 2015. № 4. С. 134-140.
12. Наволокин Н.А., Полуконова Н.В., Маслякова Г.Н., Скворцова В.В., Байтман Т.П., Бучарская А.Б., Дурнова Н.А. Противоопухолевая активность растительных экстрактов, содержащих биофлавоноиды // Российский биотерапевтический журнал. 2013. Т. 12. № 2. С. 59-59а
13. Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Полуконова Н.В., Тычина С.А., Корчаков Н.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. Оценка противоопухолевой и антикахексической активности экстракта аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) у крыс с перевитой саркомой // Сибирский онкологический журнал. 2016. Т. 15. № 1. С. 37-43.
14. Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Дурнова Н.А., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б. Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью // Патент на изобретение RU 2482863 15.02.2012
15. Полуконова А.В., Наволокин Н.А., Бибикова О.А. Цитотоксическая активность in vitro экстракта аврана на культуре клеток почек эмбрионов свиньи, зараженных онковирусом // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2013. Т. 3. № 2. С. 375.
16. Полуконова Н.В., Дурнова Н.А., Курчатова М.Н., Наволокин Н.А., Голиков А.Г. Химический анализ и способ получения новой биологически активной композиции из травы аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) // Химия растительного сырья. 2013. № 4. С. 165-173.
17. Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Полуконова А.В., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. Культура клеток почки эмбриона свиньи, инфицированных онковирусом (SPEV-2) как модельный объект для исследования цитотоксического действия противоопухолевых средств на примере экстракта аврана (*Gratiola officinalis* L.) // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2015. Т. 5. № 6. С. 926-928.
18. Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Мудрак Д.А., Прилепский А.И., Широков А.А., Бучарская А.Б., Маслякова Г.Н. Исследование цитотоксической активности экстракта аврана лекарственного и кверцетина на клеточной культуре рака шейки матки // Российский биотерапевтический журнал. 2016. Т. 15. № 1. С. 88-89.
19. Умнова О.А. Сравнение биологической активности фитохимических композиций в нативной и липосомальной формах // Вестник Московского университета. Серия 2 Химия. 2010. Т. 51 №6. С. 476- 484.
20. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with trasplanted liver cancer // Russian Open Medical Journal. 2012. Т. 1. № 2. С. 0203.

21. Polukonova N.V., Kurchatova M.N., Navolokin N.A., Bucharskaya A.B., Durnova N.A., Maslyakova G.N. A new extraction method of bioflavonoids from poisonous plant (*Gratiola officinalis* L.) // Russian Open Medical Journal. 2014. T. 3. № 3. C. 304.