

УДК 57.04

НАСЫЩЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ФЛАВОЛИГНАНАМИ СИЛИМАРИНА В СОСТАВЕ ЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

© 2021 г. М. Р. Бахман¹, Н. Б. Фельдман^{1,*}, С. Н. Орехов¹,
Н. Е. Седякина¹, Т. И. Громовых¹, С. В. Луценко¹

¹ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

*E-mail: n_feldman@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2020 г.

После доработки 16.11.2020 г.

Принята к публикации 16.11.2020 г.

Силимарин (СМ) из *Silybum marianum* (L.) представляет собой сумму флаволигнанов (силибинин, силикристин, силидианин и изосилибинин), проявляющих широкий спектр биологической активности и оказывающих противовоспалительное, противоопухолевое, гепатопротекторное, иммуномодулирующее действие. С помощью модифицированного эмульсионного метода с упариванием растворителя получены липидные наночастицы с силимарином (ЛНЧ-СМ), размер которых составил 257 ± 6 нм, ζ -потенциал -20.8 ± 1.6 мВ. Эффективность включения СМ в липидные наночастицы составила 89.8%, степень загрузки – 5.4%. Высвобождение СМ из состава полученных наночастиц носит пролонгированный характер; через 48 ч в диализную среду высвобождается лишь $68.3 \pm 5.4\%$ активного вещества. Исследована динамика включения/высвобождения СМ, входящего в состав ЛНЧ, в пленки бактериальной целлюлозы (БЦ), продуцируемые штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008. Показано, что после 24 ч инкубации максимальное насыщение СМ пленки БЦ достигает 0.745 ± 0.038 мг/см², максимальное высвобождение – 0.520 ± 0.041 мг/см². Продемонстрировано, что и золи ЛНЧ-СМ, и образцы БЦ, насыщенной ЛНЧ-СМ, проявляют низкую гемолитическую активность, что свидетельствует о потенциальной биобезопасности этих препаратов. Препарат ЛНЧ-СМ в отличие от свободного СМ проявляет фунгистатическое действие в отношении грибов *A. niger* и *C. albicans*. Как свободный СМ, так и препарат ЛНЧ-СМ подавляют рост грамположительных бактерий, однако действие препарата ЛНЧ-СМ более эффективно. Минимальная подавляющая концентрация препарата ЛНЧ-СМ для *B. subtilis* и *B. coagulans* составляет 105 и 210 мкг/мл соответственно. Обсуждается возможность разработки биосовместимых покровных материалов на основе БЦ, насыщенной ЛНЧ-СМ.

DOI: 10.1134/S1992722321020035

ВВЕДЕНИЕ

Одними из наиболее перспективных и широко изучаемых биологически активных веществ природного происхождения являются флаволигнаны силимарина (СМ), содержащиеся в расторопше пятнистой *Silybum marianum* (L.). Сухие экстракты, получаемые из расторопши пятнистой, содержат около 60% СМ, основными действующими компонентами которого являются флаволигнаны силибинин, силикристин, силидианин и изосилибинин [1].

Силимарин проявляет широкий спектр биологической активности. Он обладает способностью к подавлению TNF-индуцируемой продукции реактивных форм кислорода, улавливание свободных радикалов, препятствует перекисному окислению липидов [2, 3]. СМ также способствует снижению концентрации липопротеинов низкой

плотности в сыворотке крови, способствует утилизации этих липопротеинов печенью и таким образом снижает уровень холестерина [4]. Продемонстрировано также противовоспалительное [5], противоопухолевое [6–9], гепатопротекторное [10, 11], кардиопротекторное [12], нейропротекторное [13] и иммуномодулирующее [14, 15] действие СМ. Описано антимикробное действие СМ в отношении грамположительных бактерий [16]. СМ проявляет крайне низкую токсичность для человека даже при ежедневной дозе приема, превышающей 1.5 г, однако максимальному проявлению его биологической активности препятствует низкая растворимость в воде (<50 мкг/мл) [17].

Повышения растворимости и биодоступности СМ можно добиться путем его инкапсулирования в липосомы или другие типы наночастиц. Так, СМ был инкапсулирован в липосомы [18,

19], включался в твердые дисперсии [20] и микро-частицы [21], амфифильные хитозановые мицеллы [22].

Одним из перспективных направлений увеличения биодоступности и повышения эффективности терапевтического действия является включение флаволигнанов СМ в состав липидных наночастиц, стабилизированных эмульгаторами и находящихся в твердом состоянии при температуре тела человека [23].

Ранее на основе сложного эфира глицерина и остатков жирных кислот (“Compritol”) и неионогенного поверхностно-активного вещества (ПАВ) (Твин 80) были получены липидные наночастицы, включающие СМ (ЛНЧ-СМ). Полученные нанодисперсии проявляли более высокую терапевтическую активность в отношении повреждений печени в сравнении со свободным флаволигнаном силибинином [24]. Также были получены включающие силибинин твердые ЛНЧ на основе стеариновой кислоты и неионного детергента Brij 78 (октодецилполиоксиэтилен-78) [25]. Такие наночастицы отличались крайне медленным высвобождением силибинина и обладали стелс-эффектом, т.е. способностью избегать захвата макрофагами ретикуло-эндотелиальной системы.

В настоящей работе ЛНЧ-СМ получены на основе глицеролмоностеарата и фосфатидилхолина; изучены их физико-химические свойства и антибактериальная активность. Бактериальная целлюлоза (БЦ), продуцируемая штаммом *Glucanacetobacter hansenii* GH-1/2008, представляет собой эластичный, биосовместимый нанопористый материал, возможности медицинского применения которого активно изучаются [26]. В этом плане перспективное направление использования БЦ – получение на ее основе покровного материала с антимикробной активностью, в связи с чем поставлена задача изучить кинетику насыщения–высвобождения целлюлозой ЛНЧ-СМ, а также гемолитическую и антимикробную активность полученных пленок.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали полиэтиленгликоль PEG 400, Твин 80, додецилсульфат натрия (SDS), ЭДТА, изопропанол, этанол, фосфатно-солевой буфер (PBS), глицеролмоностеарат, L- α -фосфатидилхолин, силимарин, Сефадекс G50 (все реагенты от Sigma-Aldrich, США). Лимонная кислота, сахароза, Na₂HPO₄, NaOH имели квалификацию “ч.д.а.”.

ЛНЧ-СМ получали с помощью модифицированного эмульсионного метода с упариванием растворителя [27]. Компоненты частиц (глицеролмоностеарат, фосфатидилхолин, СМ) в мас-

совом соотношении 10:1.5:1 растворяли в минимальном объеме абсолютного этилового спирта, нагретого до 70°C. Полученный раствор добавляли по каплям в нагретую до 70°C водную фазу, содержащую PEG 400 (1% мас./об.) и изопропанол (1% мас./об.), при постоянном перемешивании со скоростью 1200 об./мин. Через 5 ч инкубации полученную дисперсию приливали при перемешивании (1000 об./мин) к равному объему охлажденного до 4°C водного раствора (гидратирующий раствор), содержащего Твин 80 (1% мас./об.) и PEG 400 (1% мас./об.), и инкубировали в течение 3 ч. Суспензию фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм и проводили дополнительную очистку липидных частиц с помощью гельфильтрации на колонке с носителем Сефадекс G50. 2 мл липидной дисперсии, включающей СМ, наносили на колонку, уравновешенную 40 мМ PBS, pH 7.4, и элюировали препарат тем же буфером при скорости потока 1.0 мл/мин. Процесс очистки контролировали с помощью детектора при λ 300 нм.

Для определения эффективности включения СМ в ЛНЧ к 1 мл дисперсии, полученной после очистки на колонке с Сефадекс G50, приливали 50 мл метанола, фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 45 мкм, отбирали 100 мкл пробы для HPLC-анализа. Анализ проводили с помощью хроматографа Agilent Technologies 1260 Infinity (США) на обращеннофазовой колонке C 18. Подвижная фаза состояла из смеси ацетонитрила и воды (30:70 об./об.) при скорости потока 1 мл/мин. Элюат с колонки мониторировали при длине волны 300 нм. Концентрацию СМ определяли в пересчете на силибинин по калибровочному графику, построенному с помощью стандартного образца силибинина. Эффективность (E) включения СМ в ЛНЧ рассчитывали по формуле: $E = [(масса\ СМ\ в\ ЛНЧ,\ мг) / (общая\ масса\ СМ,\ мг)] \times 100\%$. Степень загрузки (DL) ЛНЧ силимарином определяли по формуле: $DL = [(масса\ СМ\ в\ ЛНЧ,\ мг) / (масса\ липидов,\ мг)] \times 100\%$.

Размер частиц и ζ -потенциал определяли методом динамического рассеяния света (ДРС) на анализаторе ζ -потенциала и размера частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Великобритания). Формы и размеры ЛНЧ изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) JEOL JSM-6490LV (Япония) при увеличении $\times 10000$ и $\times 15000$. Исследуемые пробы напыляли (40 с при 40 мА) слоем 20 нм платины в автоматическом коутере JEOL JFC-1600.

Изучение динамики высвобождения СМ из ЛНЧ проводили с помощью метода диализа с некоторыми модификациями [28]. Перед использованием диализные мешки кипятили в воде в течение 10 мин с добавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты, промывали и оставляли в

деионизированной воде на 12 ч. 10 мл дисперсии ЛНЧ-СМ в диализном мешке диализировали в течение 48 ч при 37°C на шейкере VXR basic Vibrax (IKA) при перемешивании (50 об./мин) против 500 мл PBS, pH 7.4, содержащего 1% метанола. В качестве контроля использовали свободный СМ, который диализировали в аналогичных условиях. Аликвотные части опытных и контрольных образцов диализуемого раствора отбирали для анализа через определенные промежутки времени, добавляя к этому раствору тот же объем свежего буфера. Содержание СМ в диализате определяли с помощью HPLC.

В работе использовали штамм *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 ВКПМ В-10547. Для получения пленок БЦ штамм *G. hansenii* культивировали в стационарной культуре на среде, содержащей 2% сахарозы, 0.5% пептона, 0.5% дрожжевого экстракта, 0.27% Na₂HPO₄, 0.12% лимонной кислоты. Посевной материал *G. hansenii* выращивали на указанной среде при 30°C с использованием ротационного шейкера в течение 3 сут. Для получения пленок БЦ культивировали продуцент в стационарной культуре на среде в течение 15 сут при температуре 26 ± 2°C в кюветах размером 25 × 50 см. Толщина полученных пленок составляла ~150 мкм. После завершения культивирования пленки отделяли от культуральной жидкости, промывали дистиллированной водой для удаления компонентов среды и обрабатывали 1.0 М раствором NaOH при 80°C в течение 2 ч для удаления контаминаций и иммобилизованных на пленке клеток продуцента. На завершающем этапе пленки БЦ отмывали от щелочи дистиллированной водой. Отмывку прекращали, когда pH промывной жидкости достигала нейтральных значений.

Для изучения сорбции ЛНЧ-СМ на БЦ гидратированные пленки размером 4 см² инкубировали в золе ЛНЧ-СМ в течение определенных промежутков времени (от 10 мин до 24 ч) при покачивании при комнатной температуре. Концентрация СМ в золе ЛНЧ-СМ составляла 0.842 мг/мл. По истечении времени инкубации пленки извлекали из инкубационной среды и определяли концентрацию СМ, оставшегося в инкубационной среде, с помощью HPLC, как это описано выше, при длине волны λ 300 нм после разлушения ЛНЧ путем добавления 96%-ного этанола. Количество СМ, сорбированного на БЦ, вычисляли по разнице концентраций в исходной суспензии и в суспензии после извлечения пленки.

Далее изучали динамику высвобождения СМ из пленок бактериальной целлюлозы с сорбированными ЛНЧ-СМ. Влажные пленки БЦ с сорбированными на них ЛНЧ-СМ, полученные как описано выше, помещали в емкость с PBS, pH 7.4,

и инкубировали при покачивании. Через определенные промежутки времени отбирали пробы инкубационной среды и оценивали в них концентрацию высвободившегося из пленок СМ с помощью HPLC. По результатам эксперимента строили график динамики высвобождения СМ из пленок БЦ.

Гемолитическую активность ЛНЧ-СМ определяли по методу [29] с некоторыми модификациями. В экспериментах использовали цельную кровь аутобредных половозрелых самок мышей ICR (CD-1), собранную посредством декапитации. Содержание животных и все манипуляции проводили в соответствии с требованиями законодательства Российской Федерации, положениями “Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (ETS 123), положениями Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Washington D.C., 2011) и другими нормами международного права, регламентирующими вопросы содержания и использования лабораторных (экспериментальных) животных. К 1 мл золя ЛНЧ-СМ в PBS (pH 7.4) добавляли 100 мкл мышьиной крови и инкубировали смесь 1 ч при 37°C. Раствор центрифугировали 10 мин при 5000 об./мин. Высвободившийся в ходе лизиса гемоглобин регистрировали фотометрически в супернатантах при длине волны 540 нм. В качестве препарата отрицательного контроля (отсутствии гемолиза) использовали PBS, pH 7.4, в качестве препарата положительного контроля со 100%-ной гемолитической активностью – 1.5%-ный (мас./об.) раствор SDS. Контрольные препараты подвергали той же процедуре, что и опытные образцы. Гемолитическую активность (*H*) ЛНЧ-СМ в процентах вычисляли по формуле: $H = [(A_{\text{ЛНЧ}} - A_{\text{PBS}}) / A_{\text{SDS}}] \times 100\%$, где $A_{\text{ЛНЧ}}$ – оптическая плотность супернатанта в препаратах, содержащих ЛНЧ-СМ, A_{PBS} , A_{SDS} – оптическая плотность супернатанта отрицательного и положительного контроля.

Для определения гемолитической активности фосфатидилхолина и Твин 80 готовили их растворы (1 и 0.625% соответственно) в PBS, pH 7.4. Перед определением гемолитической активности фосфатидилхолина его раствор подвергали ультразвуковой обработке. Для определения гемолитической активности свободного СМ готовили его суспензию (0.842 мг в 1 мл PBS, pH 7.4). Определение гемолитической активности БЦ проводили в PBS, содержащем фрагмент пленки (230 мг на 1 мл) (контрольный образец); опытный образец содержал в 1 мл PBS 230 мг целлюлозы, насыщенной ЛНЧ-СМ.

Оценку антимикробной активности ЛНЧ-СМ проводили методом диффузии в агар [30] с использованием тест-культур условно-патогенных

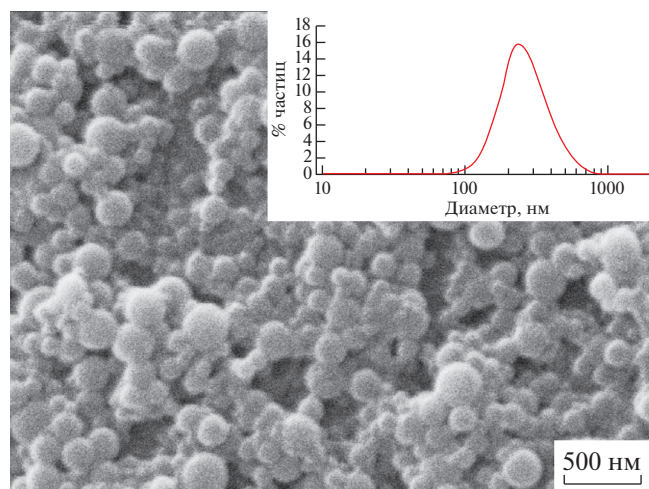


Рис. 1. СЭМ-изображение ЛНЧ-СМ и график их распределения по размерам, полученный с помощью анализатора Malvern Zetasizer Nano ZS.

грибов и бактерий: *Aspergillus niger* INA 00760, *Candida albicans* ATCC 2091, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *B. coagulans* 429, *Escherichia coli* ATCC 8739. На поверхность агара помещали вырезанные из пленки БЦ диски, на которые предварительно наносили по 420 мкг СМ, входящего в состав ЛНЧ; в качестве контрольных образцов использовали диски БЦ диаметром 6 мм, содержащие 420 мкг свободного СМ. Контролем чувствительности тест-организма служили стандартные диски с нистатином (“НИИ Пастера”, 40 мкг/мл) и амоксициклом (“НИИ Пастера”, 10 мкг/мл).

Минимальную подавляющую концентрацию (МПК) ЛНЧ-СМ определяли методом последовательных разведений на штаммах грамположительных бактерий *B. subtilis* ATCC 6633, *B. coagulans* 429 и грамотрицательных бактерий *E. coli* ATCC 8739. Эксперименты проводили в жидких средах: мясо-пептонном бульоне с глюкозой (для *Bacillus*) или среде Кесслера (для *E. coli*). Суспензию инокулята тест-организмов разводили в стерильном физиологическом растворе, доводя до оптической плотности 0.5 по стандарту мутности МакФарланда, а затем разбавляли питательной средой в 100 раз. В стерильные пробирки, содержащие каждая по 1 мл разведения препарата на питательной среде, добавляли инокулят в объеме 1 мл. Конечные концентрации препарата в пробирках составляли от 420 до 26.25 мкг/мл. В контрольную пробирку добавляли по 1 мл чистой питательной среды и инокулята. Инкубировали пробирки 24 ч при 37°C, после чего определяли МПК как минимальную концентрацию препарата, полностью предотвращающую видимый рост тест-организма [30].

Обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Ex-

cel 2010 и Microcal Origin 8.0 (OriginLab Corporation). Все данные представлены как средние арифметические значения (M) и стандартные отклонения ($\pm SD$). Для выявления статистической значимости различий применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA); различия считали достоверными при значениях $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью эмульсионного метода с упариванием растворителя при высокой температуре с последующим затвердеванием частиц при низкой температуре получен препарат ЛНЧ-СМ, средний размер которых по данным ДРС составил 257.0 ± 6.3 нм (рис. 1). ζ -потенциал представляет собой важный параметр, величина которого позволяет судить о стабильности коллоидных растворов [31]. В случае ЛНЧ ζ -потенциал зависит от природы частиц, состава буферной среды, характера расположения молекул липидов на поверхности частиц, природы и локализации молекул ПАВ на поверхности раздела фаз и других параметров. ζ -потенциал полученных ЛНЧ-СМ составил -20.8 ± 1.6 мВ, при этом золь оставался стабильным при 4°C в течение по крайней мере двух недель. В течение этого срока параметры, характеризующие стабильность золя (образование агрегатов, распределение частиц по размерам, эффективность включения СМ), практически не изменялись (данные не приводятся). Эффективность включения СМ в ЛНЧ была достаточно высока и составила 89.8%; степень загрузки – 5.4%.

Исследование динамики высвобождения СМ из состава полученных ЛНЧ проводили при pH 7.4, что может имитировать высвобождение препарата при его попадании в плазму крови человека при внутривенном введении. Как видно на рис. 2, в первые часы инкубации свободный СМ довольно быстро высвобождается в диализную среду, практически достигая в ней полумаксимального (47.05%) накопления чуть больше чем за 1 ч. В дальнейшем скорость высвобождения постепенно снижалась; через 24 ч в диализной среде оказывалось $92.7 \pm 8.34\%$, а через 48 ч – $94.1 \pm 8.46\%$ от общего количества свободного СМ. В то же время высвобождение СМ, находящегося в составе ЛНЧ, носит пролонгированный характер; через 1 ч инкубации высвобождается лишь $11.8 \pm 0.94\%$ СМ; через 24 ч – $61.8 \pm 4.97\%$, а через 48 ч – $68.3 \pm 5.44\%$. Таким образом, золи ЛНЧ-СМ можно рассматривать как терапевтическое транспортное средство, которое может найти применение для доставки и пролонгированного высвобождения СМ.

Описанное в литературе антиоксидантное, мембранопротекторное, противовоспалительное, противоопухолевое действие СМ [1] позволяет предполагать перспективность его примене-

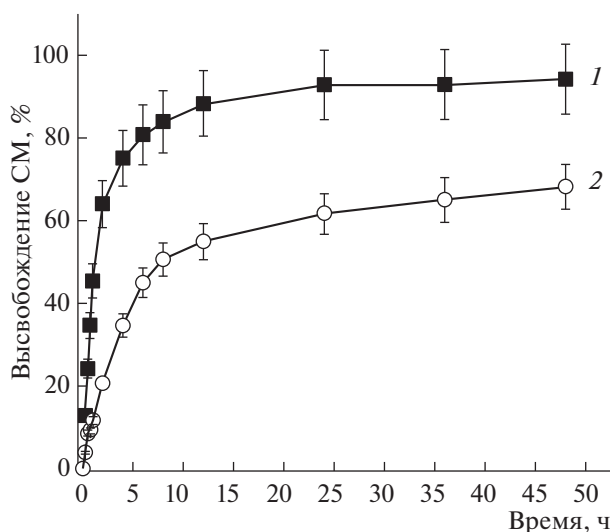


Рис. 2. Динамика высвобождения различных форм силимарина в диализную среду: 1 – СМ, 2 – ЛНЧ-СМ.

ния в составе покровных материалов, предназначенных для лечения кожных и ожоговых травм, псориаза, аутоиммунных заболеваний и др. В связи с этим представляется важным поиск путей решения вопроса о возможностях применения ЛНЧ-СМ в составе покровных материалов и трансдермальных систем медицинского назначения. В настоящей работе исследована возможность получения подобного материала на основе пленок БЦ, продуцируемой штаммом *Glucanacetobacter hansenii* GH-1/2008. Бактериальная целлюлоза представляет собой биосовместимый нанопористый материал, области применения которого активно изучаются [26].

Результаты эксперимента по насыщению целлюлозы препаратом ЛНЧ-СМ приведены на рис. 3. Насыщение целлюлозы ЛНЧ-СМ носило экспоненциальный характер. Полумаксимальное насыщение пленки БЦ достигалось через 4 ч инкубации и составляло 0.579 ± 0.029 мг/см²; максимальное насыщение – через 24 ч и составляло 0.745 ± 0.038 мг/см². Таким образом, 89.1% СМ, находящегося в составе ЛНЧ-СМ в инкубационной среде, включалось в БЦ, что может свидетельствовать о ее достаточно высокой пористости и емкости. Как видно на рис. 4, ЛНЧ-СМ активно взаимодействуют с фибриллами БЦ, создавая на ее поверхности довольно плотное нанопокрывание.

Результаты исследования высвобождения СМ из пленок БЦ, насыщенных ЛНЧ-СМ, представлены на рис. 5. Высвобождение СМ носило замедленный характер; через 1 ч инкубации высвобождалось 0.162 ± 0.013 мг/см² СМ (21.6% от общей массы СМ, сорбированного на БЦ); через 2 ч – 0.248 ± 0.019 мг/см² (33.1%). Максимальное высвобождение СМ из пленки БЦ отмечалось через

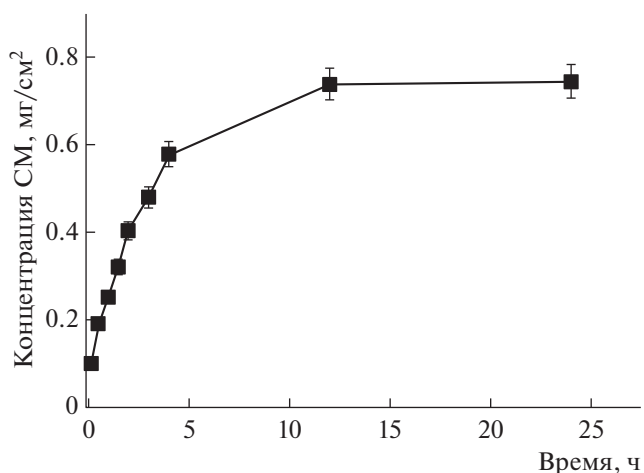


Рис. 3. Зависимость насыщения бактериальной целлюлозы препаратом ЛНЧ-СМ от времени инкубации.

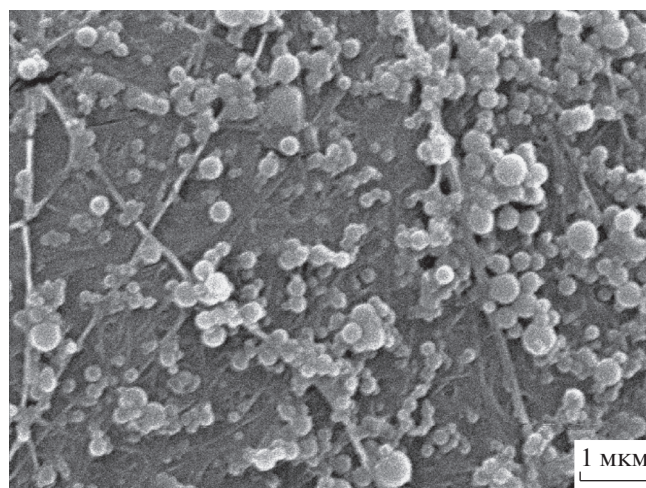


Рис. 4. СЭМ-изображение микроструктуры поверхности бактериальной целлюлозы, насыщенной ЛНЧ-СМ.

24 ч инкубации и составляло 0.520 ± 0.041 мг/см² (69.3%). Таким образом, практическое применение ЛНЧ-СМ в составе лекарственных форм на основе пленок БЦ может иметь существенные преимущества в результате пролонгирования высвобождения СМ, обеспечиваемого как за счет замедленного высвобождения самих наночастиц из состава пленки, так и замедленного высвобождения СМ из состава наночастиц.

Ранее было показано, что СМ может быть использован при лечении экземы, псориаза, рака кожи и других заболеваний [32, 33]. Также был описан иммуносупрессивный эффект силибинина (основного флаволигнана СМ). Подавление пролиферации и индукция силибинином апоптоза Т-лимфоцитов на фоне подавления экспрессии провоспалительных цитокинов приводили к сни-

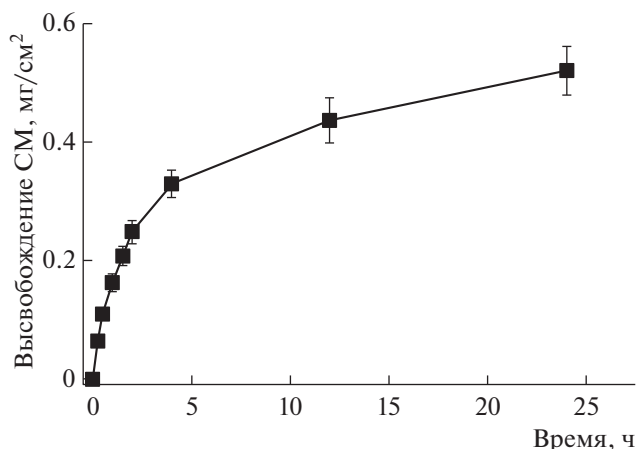


Рис. 5. Динамика высвобождения СМ, входящего в состав ЛНЧ-СМ, из пленки бактериальной целлюлозы.

жению иммунной реакции организма на здоровые ткани, что может оказаться важным при лечении аутоиммунных заболеваний [34]. Таким образом, разработка биосовместимых покровных материалов на основе БЦ, насыщенной ЛНЧ-СМ, представляется актуальным направлением расширения арсенала средств терапии раневых и ожоговых травм, патологий кожных покровов и аутоиммунных заболеваний.

Для оценки уровня безопасности ЛНЧ-СМ, бактериальной целлюлозы, насыщенной наночастицами, а также ключевых компонентов ЛНЧ использовали тест на гемолитическую активность. Как видно на рис. 6, наиболее высокой гемолитической активностью ($16.8 \pm 1.4\%$) обладал гидратирующий раствор Твин 80, используемый при получении ЛНЧ-СМ. Очевидно, что после очистки ЛНЧ-СМ, проведенной с помощью гель-фильтрации, содержание Твин 80 в золе должно было значительно снижаться и не вносить существенного вклада в гемолитическую активность препарата. Действительно, очищенный золь ЛНЧ-СМ проявлял весьма низкую гемолитическую активность ($8.7 \pm 0.7\%$). При этом препарат свободного СМ практически не проявлял гемолитической активности ($0.4 \pm 0.1\%$), а фосфатидилхолин проявлял крайне низкую активность ($0.8 \pm 0.1\%$). Контрольный образец БЦ, не содержащей ЛНЧ-СМ, проявлял несколько более высокую гемолитическую активность ($12.8 \pm 1.0\%$) в сравнении с образцом БЦ, насыщенной ЛНЧ-СМ ($10.1 \pm 0.9\%$), что подтверждает данные об антигемолитическом действии СМ [35].

По данным [36] препараты, характеризующиеся значениями гемолиза, превышающими 25%, рассматриваются как факторы высокого риска; препараты, вызывающие гемолиз, не превышаю-

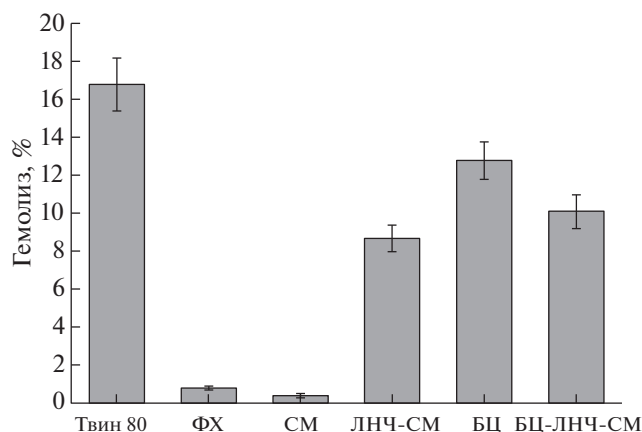


Рис. 6. Оценка *in vitro* гемолитической активности полученных препаратов и их компонентов; ФХ — фосфатидилхолин; БЦ-ЛНЧ-СМ — бактериальная целлюлоза, насыщенная ЛНЧ-СМ.

щий 10%, считаются негемолитическими. Таким образом, в соответствии с полученными в настоящей работе данными препарат ЛНЧ-СМ и образцы насыщенной им бактериальной целлюлозы могут рассматриваться в качестве достаточно безопасных с точки зрения проявления гемолитической активности.

Учитывая, что свободный СМ проявляет антимикробную активность [37], провели сравнительное исследование антимикробной активности свободного СМ и ЛНЧ-СМ в отношении штаммов условно-патогенного гриба *A. niger*, дрожжевого гриба *C. albicans*, грамположительных бактерий — *B. subtilis*, *B. coagulans*, а также грамотрицательной бактерии *E. coli* (табл. 1). Свободный СМ проявлял слабое подавляющее действие в отношении грамположительных бактерий, в то время как препарат ЛНЧ-СМ оказывал ингибирующее действие в отношении микроорганизмов всех исследуемых штаммов.

Согласно [38] действие свободного силибинина (одного из флаволигнанов СМ) на *C. albicans* приводит к изменению проницаемости клеточных мембран, снижению метаболической активности клеток, подавлению формирования биопленок и индукции апоптоза. Как видно из табл. 1, препарат ЛНЧ-СМ в отличие от свободного СМ проявляет фунгистатическое действие в отношении *A. niger* и *C. albicans*, менее выраженное в сравнении с нистатином. В отличие от свободного СМ наличие антигрибкового эффекта у ЛНЧ-СМ может быть связано с эффективным взаимодействием ЛНЧ с поверхностью бактериальной клетки с последующим высвобождением флаволигнанов СМ непосредственно на поверхности клетки-мишени.

Как известно, свободный СМ не проявляет антибактериальной активности в отношении

Таблица 1. Антимикробная активность препаратов силимарина в отношении условно-патогенных грибов и бактерий (зона угнетения роста, мм)

Тест-организм	СМ	ЛНЧ-СМ	Нистатин	Амоксиклав
<i>Aspergillus niger</i> INA 00760	0	9.1 ± 0.6	14.9 ± 0.3	
<i>Candida albicans</i> ATCC 2091	0	13.4 ± 0.4	24.8 ± 0.6	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11.0 ± 0.3	20.2 ± 0.6		30.1 ± 0.3
<i>Bacillus coagulans</i> 429	8.0 ± 0.2	16.4 ± 0.7		24.8 ± 0.2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	7.3 ± 0.5		21.3 ± 0.3

грамотрицательной бактерии *E. coli*. В данном случае отсутствие антибактериального эффекта может объясняться стимулирующим действием СМ на синтез ДНК в клетках *E. coli*, а также отсутствием его влияния на уровень синтеза клеточных белков и РНК [39]. В проведенном эксперименте в отличие от свободного СМ препарат ЛНЧ-СМ проявлял бактериостатическую активность, крайне низкую в сравнении с активностью амоксиклава (табл. 1).

Грамположительные бактерии более чувствительны к действию свободного СМ, поскольку он ингибирует внутриклеточный синтез белков и РНК [39]. Как видно из табл. 1, и свободный СМ, и препарат ЛНЧ-СМ подавляют рост бактерий *B. subtilis* и *B. coagulans*. При этом действие препарата ЛНЧ-СМ более эффективно – его МПК для *B. subtilis* и *B. coagulans* составляет 105 мкг/мл и 210 мкг/мл соответственно. Препарат свободного СМ оказывает слабый бактериостатический эффект (в диапазоне исследуемых концентраций от 420 до 26.25 мкг/мл МПК не достигалась).

Таким образом, препарат ЛНЧ-СМ проявляет более высокую антимикробную активность по сравнению со свободным СМ, что может быть обусловлено специфическим связыванием ЛНЧ-СМ с поверхностью микробных клеток. При этом наиболее высокая активность ЛНЧ-СМ отмечается в отношении грамположительных бактерий *B. subtilis* и *B. coagulans*; в отношении грибов *A. niger* и *C. albicans* препарат ЛНЧ-СМ проявляет фунгистатический эффект. По-видимому, широких перспектив для использования в качестве эффективных антимикробных средств ЛНЧ-СМ не имеют вследствие их низкой токсичности. Однако как свободный СМ, так и ЛНЧ-СМ могут рассматриваться в качестве перспективных средств, дополняющих действие антибиотиков [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В отличие от плохо растворимого в биологических жидкостях свободного СМ ЛНЧ-СМ образуют устойчивые водные золи, наличие которых может значительно расширить спектр терапевтического применения СМ на основе разработки новых лекарственных форм. Кроме того, в состав

липидной наночастицы флаволигнаны СМ оказываются надежно защищенными от агрессивной внешней среды. Пролонгированное высвобождение СМ из ЛНЧ создает дополнительные преимущества при рассмотрении путей введения и возможностей его терапевтического применения. Практическое отсутствие у ЛНЧ-СМ и их компонентов гемолитической активности наряду с литературными данными о крайне низкой токсичности СМ, его высокой антиоксидативной, противовирусной, противовоспалительной, антиангиогенной и противоопухолевой активности наглядно свидетельствует об актуальности разработки на основе этих наночастиц и биосовместимого материала БЦ новых противоожоговых и раневых повязок, а также систем трансдермальной доставки.

Работа выполнена при поддержке проекта повышения конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gazák R., Walterová D., Kren V.* // *Curr. Med. Chem.* 2007. V. 14. № 3. P. 315.
<https://doi.org/10.2174/092986707779941159>
2. *Manna S.K., Mukhopadhyay A., Van N.T., Aggarwal B.B.* // *J. Immunol.* 1999. V. 163. № 12. P. 6800.
3. *Basaga H., Poli G., Tekkaya C., Aras I.* // *Cell Biochem. Funct.* 1997. V. 15. № 1. P. 27.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0844\(199703\)15:1<27::AID-CBF714>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0844(199703)15:1<27::AID-CBF714>3.0.CO;2-W)
4. *Skottová N., Krecman V.* // *Acta Univ. Palacki. Olomuc. Fac. Med.* 1998. V. 141. P. 39.
5. *Wu C.H., Huang S.M., Yen G.C.* // *Antioxid. Redox Signal.* 2011. V. 14. № 3. P. 353.
<https://doi.org/10.1089/ars.2010.3134>
6. *Wang Y.X., Cai H., Jiang G. et al.* // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2014. V. 15. № 16. P. 6791.
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.16.6791>
7. *Woo S.M., Min K.J., Kim S. et al.* // *Chem.-Biol. Interact.* 2014. V. 211. P. 36.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.01.004>
8. *Pirouzpanah M.B., Sabzichi M., Pirouzpanah S. et al.* // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2015. V. 16. № 5. P. 2087.
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2015.16.5.2087>

9. Tyagi A., Agarwal C., Harrison G. et al. // *Carcinogenesis*. 2004. V. 25. № 9. P. 1711.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgh180>
10. Féher J., Lengyel G. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012. V. 13. № 1. P. 210.
<https://doi.org/10.2174/138920112798868818>
11. Vargas-Mendoza N., Madrigal-Santillán E., Morales-González A. et al. // *World J. Hepatol.* 2014. V. 6. № 3. P. 144.
<https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i3.144>
12. Rao P.R., Viswanath R.K. // *Exp. Clin. Cardiol.* 2007. V. 12. № 4. P. 179.
13. Borah A., Paul R., Choudhury S. et al. // *CNS Neurosci. Ther.* 2013. V. 19. № 11. P. 847.
<https://doi.org/10.1111/cns.12175>
14. Gharagozloo M., Karimi M., Amirghofran Z. // *Int. Immunopharmacol.* 2013. V. 16. № 2. P. 243.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.04.016>
15. Esmaeil N., Anaraki S.B., Gharagozloo M., Moayedi B. // *Int. Immunopharmacol.* 2017. V. 50. P. 194.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.06.030>
16. Lee D.G., Kim H.K., Park Y. et al. // *Arch. Pharm. Res.* 2003. V. 26. № 8. P. 597.
<https://doi.org/10.1007/BF02976707>
17. Di Costanzo A., Angelico R. // *Molecules*. 2019. V. 24. № 11. Art. 2155.
<https://doi.org/10.3390/molecules24112155>
18. El-Samaligy M.S., Afifi N.N., Mahmoud E.A. // *Int. J. Pharm.* 2006. V. 308. № 1–2. P. 140.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.006>
19. Feldman N.B., Gromovkykh T.I., Sedyakina N.E. et al. // *BioNanoSci.* 2018. V. 8. № 4. P. 971.
<https://doi.org/10.1007/s12668-018-0556-x>
20. Sun N., Wei X., Wu B. et al. // *Powder Technol.* 2008. V. 182. P. 72.
<https://doi.org/10.1016/j.powtec.2007.05.029>
21. Abrol S., Trehan A., Katare O.P. // *Drug Deliv.* 2004. V. 11. № 3. P. 185.
<https://doi.org/10.1080/10717540490433958>
22. Wu Y.P., Huo M.R., Zhou J.P. // *Yaoxue Xuebao*. 2009. V. 44. P. 651.
23. Bhatt S., Sharma J., Singh M., Saini V. // *Acta Pharm. Sci.* 2018. V. 56. № 3. P. 27.
<https://doi.org/10.23893/1307-2080.APS.05616>
24. Cengiz M., Kutlu H.M., Burukoglu D.D., Ayhanci A. // *Food Chem. Toxicol.* 2015. V. 77. P. 93.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.011>
25. Zhang, J.Q., Liu J., Li X.L., Jasti B.R. // *Drug Deliv.* 2007. V. 14. P. 381.
<https://doi.org/10.1080/10717540701203034>
26. Громовых Т.И., Садыкова В.С., Луценко С.В. и др. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2017. Т. 53. № 1. С. 69.
<https://doi.org/10.7868/S0555109917010093>
27. Liu K., Sun J., Wang Y. et al. // *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2008. V. 34. № 5. P. 465.
<https://doi.org/10.1080/03639040701662230>
28. Zhang X., Lu S., Han J. et al. // *Pharmazie*. 2011. V. 66. P. 404.
<https://doi.org/10.1691/ph.2011.0350>
29. Elmowafy M., Viitala T., Ibrahim H.M. et al. // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2013. V. 50. № 2. P. 161.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.06.012>
30. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. // *J. Pharm. Anal.* 2016. V. 6. № 2. P. 71.
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
31. Garcia R.L., Rondero A.G. // *J. Chem. Dermatol. Sci. Appl.* 2015. V. 5. № 2. P. 62.
<https://doi.org/10.4236/jcdsa.2015.52008>
32. Corchete P. // *Bioactive molecules and medicinal plants* / Eds. Ramawat K., Merillon J. Berlin; Heidelberg: Springer, 2008. P. 123.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-74603-4_6
33. Khan A.Q., Khan R., Tahir M. et al. // *Nutr. Cancer*. 2014. V. 66. № 2. P. 249.
<https://doi.org/10.1080/01635581.2014.863365>
34. Dupuis M.L., Conti F., Maselli A. et al. // *Front. Immunol.* 2018. V. 9. Art. 1903.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01903>
35. Valenzuela A., Barriá T., Guerra R., Garrido A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985. V. 126. P. 712.
[https://doi.org/10.1016/0006-291x\(85\)90243-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(85)90243-8)
36. Amin K., Dannenfels R.M. // *J. Pharm. Sci.* 2006. V. 95. P. 1173.
<https://doi.org/10.1002/jps.20627>
37. de Oliveira D.R., Tintino S.R., Braga M.F. et al. // *BioMed Res. Int.* 2015. Art. 292797.
<https://doi.org/10.1155/2015/292797>
38. Yun D.G., Lee D.G. // *IUBMB Life*. 2017. V. 69. № 8. P. 631.
<https://doi.org/10.1002/iub.1647>
39. Lee D.G., Kim H.K., Park Y. // *Arch. Pharm. Res.* 2003. V. 26. № 8. P. 597.
<https://doi.org/10.1007/BF02976707>