

УДК: 615.076.7

АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ СПИРТОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ РАСТЕНИЙ СЕДАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ УРАЛЬСКОЙ ФЛОРЫ

Проскуряков Алексей Анатольевич¹, Батенева Влада Андреевна^{2,5}, Першуков Владимир Аркадьевич³, Симарзина Вероника Михайловна⁴, Корнилов Даниил Олегович⁴, Шарова Елена Александровна^{1,6}, Мельникова Ольга Александровна¹

¹Кафедра фармации

²Кафедра гигиены и медицины труда

³Кафедра госпитальной терапии

⁴Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

⁵ФБУН «Екатеринбургский медицинский-научный центр профилактики и охраны здоровья рабочих промпредприятий»

⁶ФГБУН Ботанический сад УрО РАН

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Высокий уровень стресса в современном обществе, имея тенденцию к росту, все больше актуализирует поиск и разработку новых, безопасных лекарственных препаратов, применение которых было бы возможно на ранних стадиях стресс-ассоциированных расстройств и для профилактики подобных заболеваний. Наибольший интерес в этой связи приобретают препараты на основе лекарственных и перспективных, известных народной медицине, растений. Однако безопасность любых средств относительна и для оценки их перспективности требуется установление степени цитотоксического действия. **Цель исследования** – изучение цитотоксичности спиртовых экстрактов растений, имеющих седативные свойства, для установления пригодности к использованию в составе лекарственных препаратов. **Материалы и методы.** Нами использованы экстракты из предварительно заготовленного сырья зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), зверобоя пятнистого (*Hypericum maculatum* Crantz), василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.), дербенника иволистного (*Lythrum salicaria* L.), полученные фармакопейным методом со спиртом этиловым 70% в соотношении 1:10, проведен анализ цитотоксичности 2 индивидуальных и 1 смеси экстрактов in vitro методом оценки жизнеспособности культуры клеток при непосредственном введении к ним исследуемых растворов. **Результаты.** В образце интактного контроля доля жизнеспособных клеток составила 100%, в экстракте василька (1:16) и его последовательных десятичных разведениях – 4,5%, 54%, 76,8 и 69%, в экстракте дербенника – 35,7%, 73,2%, 83%, 74,9%, в смеси экстрактов – 18,7%, 71,7%, 71,3%, 76%, соответственно. Контроль экстрагента – раствор спирта 70% (1:16) с серией последовательных десятичных разведений: 69,2%, 71,1%, 92,5%, 91,4%. **Выводы.** Экспериментально установлено, что исследуемые спиртовые экстракты обладают наименьшей цитотоксичностью при разведении 1:1600 (62,5 мкг/мл), для экстракта дербенника и смеси экстрактов доля жизнеспособных клеток превысила 70% уже при разведении 1:160 (625 мкг/мл).

Ключевые слова: спиртовые экстракты, цитотоксичность, *Hypericum perforatum*, *Hypericum maculatum*, *Centaurea scabiosa*, *Lythrum salicaria*.

CYTOTOXICITY ANALYSIS OF ALCOHOLIC EXTRACTS OF MEDICINAL AND PROMISING SEDATIVE PLANTS OF THE URAL FLORA

Proskuryakov Alexey Anatolievich¹, Bateneva Vlada Andreevna^{2,5}, Pershukov Vladimir Arkadievich³, Simarzina Veronika Michailovna⁴, Kornilov Daniil Olegovich⁴, Sharova Elena Alexandrovna^{1,6}, Melnikova Olga Alexandrovna¹

¹Department of Pharmacy

²Department of Occupational Hygiene and Medicine

³Department of Hospital Therapy

⁴Department of Medical Microbiology and Clinical Laboratory Diagnostics

Ural state medical university

⁵Yekaterinburg Medical Research Center for Prophylaxis and Health Protection in Industrial Workers

⁶Institute Botanic Garden, Ural Branch, Russian Academy of Sciences
Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. The high level of stress in modern society increasingly actualizes research and development of new, safe drugs, use of which would be possible at early stages of stress-associated disorders and for prevention of such diseases. Thereby, the greatest interest in preparations based on medicinal and promising plants. However, safety of any remedies is relative, and to assess their prospects, it's necessary to establish the degree of cytotoxic action. **The aim of the study** is to study the cytotoxicity of alcoholic extracts of plants with sedative properties in order to determine their suitability for use in medicinal preparations. **Material and methods.** We used extracts from pre-prepared raw materials of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. and *Hypericum maculatum* Crantz), cornflower (*Centaurea scabiosa* L.), willow-leaved turf (*Lythrum salicaria* L.), obtained by pharmacopoeial method with ethanol 70% in the ratio 1:10, cytotoxicity of 2 individual and 1 mixture of extracts was analyzed in vitro viability assessment of cell culture at direct injection of the studied solutions. **Results.** Percentage of viable cells in the intact control sample was 100%, in cornflower extract (1:16), its serial decimal dilutions - 4.5%, 54%, 76.8 and 69%, in turfgrass extract - 35.7%, 73.2%, 83%, 74.9%, in extracts mixture - 18.7%, 71.7%, 71.3%, 76%, respectively. The control extractant was a solution of 70% alcohol (1:16) with a series of serial decimal dilutions: 69,2%, 71,1%, 92,5%, 91,4%. **Conclusion.** We experimentally found that the studied alcoholic extracts have the lowest cytotoxicity at dilution 1:1600 (62.5 µg/mL), for turfgrass extract and extracts mixture the proportion of viable cells exceeded 70% at dilution 1:160 (625 µg/mL).

Keywords: alcoholic extracts, cytotoxicity, *Hypericum perforatum*, *Hypericum maculatum*, *Centaurea scabiosa*, *Lythrum salicaria*.

ВВЕДЕНИЕ

В наши дни практически каждый сталкивается с высоким уровнем стресса в своей повседневной жизни, это и нагрузки на работе, связанные, например, с монотонным трудом или вынужденным социальным отчуждением, и воздействие неблагоприятной окружающей среды, не говоря уже о геополитических и макроэкономических потрясениях [1]. Кроме того, с каждым годом и без того немалое воздействие стресса только растет, вызывая закономерный рост числа заболеваний нервной системы, что подтверждают данные статистики по основным классам заболеваний за последние три года – 2020-2023 [2]. Подобные тенденции в значительной мере актуализируют поиск и разработку новых лекарственных препаратов седативного действия, главным критерием которых должна быть их безопасность, позволяющая приступать к лечению на самых ранних стадиях болезни или даже профилактировать ее возникновение.

Наиболее же близкими к данной категории оказываются лекарственные растительные препараты, обладающие достаточной эффективностью при сравнительно незначительном числе побочных эффектов и противопоказаний к применению. Однако, стоит отметить, что их номенклатура на современном фармацевтическом рынке достаточно ограничена и представлена в основном монопрепаратами, не обеспечивающими комплексного воздействия на организм [3]. Поиск новых перспективных составов седативного действия требует подтверждения безопасности используемого растительного сырья, для установления возможности приема подобных средств внутрь. Наиболее оптимальным методом для чего является исследование цитотоксичности на клеточных культурах.

Цель исследования – изучение цитотоксичности растительных спиртовых экстрактов дербенника иволистного, василька шероховатого и равной смеси данных экстрактов с экстрактами зверобоев продырявленного и пятнистого для установления их пригодности к использованию в составе лекарственных препаратов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для получения экстрактов были заготовлены на территории природного парка «Река Чусовая» трава дербенника иволистного (*Lythrum salicaria* L.) и василька шероховатого (*Centaurea scabiosa* L.), кроме того, были отобраны образцы травы зверобоев пятнистого (*Hypericum maculatum* Crantz.) и продырявленного (*Hypericum perforatum* L.). После чего сырье

было высушено с применением естественной сушки на хорошо проветриваемом чердаке с металлической крышей, по результатам которой все образцы сырья удовлетворяли требованиям Государственной Фармакопеи XV издания. Непосредственно приготовление экстрактов проводилось по фармакопейной методике путем взятия точной навески в 5,0 грамм в соотношении 1:10 со спиртом этиловым 70% в мерных колбах на 50 мл, после чего экстракт на 24 часа помещался в темное место при комнатной температуре. Полученные экстракты фильтровали через бумажный фильтр и брали аликвоту по 3 мл в пробирках типа Эппендорф. Таким образом, были приготовлены: экстракт василька (образец 1), экстракт дербенника (образец 2) и равная их смесь в соотношении 1:1:1 с экстрактами зверобоев продырявленного и пятнистого соответственно (образец 3). Исследование цитотоксичности проводили с образцами 1-3, интактным контролем и контролем по экстрагенту со спиртом этиловым 70%.

1.1. Культивирование клеточной линии.

Экспериментальной клеточной моделью были выбраны костномозговые стволовые клетки человека линии SCP-1. Клетки культивировали во флаконах T-25 (Sarstedt, Germany) с адгезивным покрытием в среде с содержанием DMEM 88%, FBS 10%, L-глутамина 0,01%, в CO₂ инкубаторе (Panasonic (Sanyo) MCO-15A, Japan) с концентрацией CO₂ 5%, при температуре 37 °C. При достижении 90-100% конfluence выполняли пассирование клеток следующим способом: удаляли отработанную среду, клетки дважды промывали раствором солей HBSS без ионов Ca и Mg, затем во флакон вносили 0,25% раствор трипсина с ЭДТА в объеме 2,5 мл. Раствор удаляли после 10 секунд экспозиции. Флакон ставили в CO₂ инкубатор на 1 мин 30 сек. Затем, в него вносили 10 мл свежей сывороточной среды. С помощью светового инвертированного микроскопа (Nexscope NIB620FL, China) контролировали отделение клеток от подлежащей поверхности. Клеточную суспензию отбирали в пробирку и центрифугировали со скоростью 1600 rpm 3 мин. Надосадочную жидкость удаляли. Осадок ресуспендировали в 15 мл свежей сывороточной среды, после чего клеточную суспензию вносили в 2 новых культуральных флакона по 5 мл (трехкратное разбавление культуры) [4]. Для проведения эксперимента клетки в концентрации, установленной путем подсчета в камере Горяева, и равной 550 000 клеток/мл вносили в 96-луночный планшет и культивировали 24 часа.

1.2. Подготовка исследуемых растворов.

Для исследования использовался метод прямого контакта. В 2 мл пробирках типа Эппендорф готовили рабочие растворы на основе культуральной среды, указанной выше, с массовой долей исследуемого экстракта 6,25 мг/мл (соотношение 1:16), которую, после тщательного встряхивания на микроцентрифуге – вортексе десятикратными разведениями разбавляли до других рабочих концентраций: 625; 62,5; 6,25 мкг/мл. В аналогичной пробирке готовили раствор на основе культуральной среды со стоковой объемной долей спирта в 70% - из 96% спирта, после тщательного встряхивания на микроцентрифуге – вортексе разведением в 16 раз готовили первую рабочую концентрацию, после чего выполняли десятичные разведения [5].

1.3. Дизайн эксперимента.

Из лунок с клеточной культурой удаляли культуральную среду и добавляли в 36 лунок приготовленные растворы исследуемых экстрактов, в 4 лунки добавляли растворы спирта этилового, в соответствии с приведенной схемой (Рис. 1). Время экспозиции 24 часа.

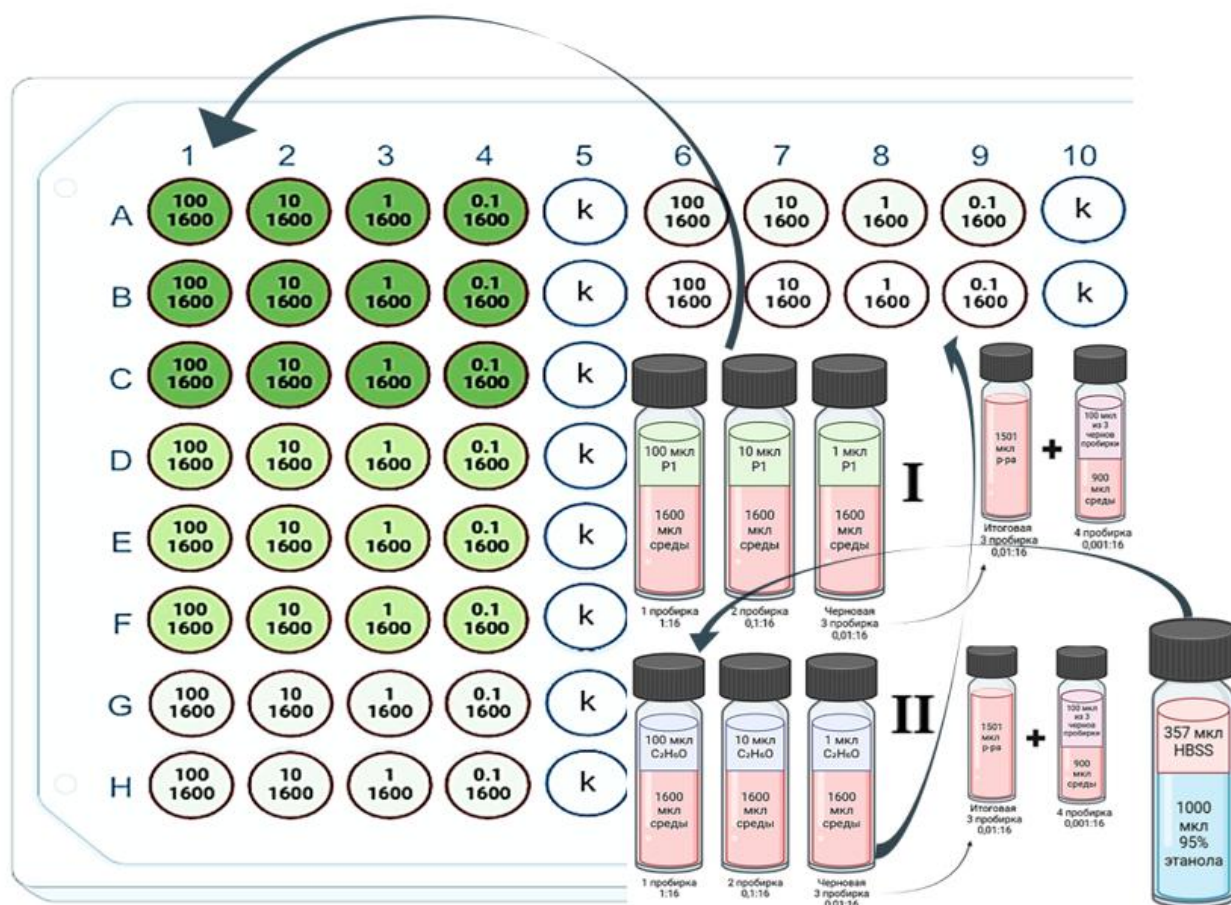


Рис. 1 Схема проведения эксперимента по установлению уровня цитотоксичности экстрактов

Примечание: в лунки A-H (1-4) и A (6-9) добавляли разведения экстрактов, лунки A-H (5) и A-B (10) – интактный контроль, лунки B (6-9) содержат последовательные разведения спирта, под цифрой I представлен алгоритм получения рабочих растворов экстрактов, под цифрой II – спирта

1.4. Приготовление образцов

Полученные образцы анализировали методом МТТ-теста. Для этого сухой реагент МТТ (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) растворяли в концентрации 5 мг/мл в 1х растворе PBS. Затем 1 мл стокового раствора МТТ (5 мг/мл) смешивали с 9 мл культуральной среды (рабочая концентрация МТТ 0,5 мг/мл). После 24 часов экспозиции с исследуемыми металлическими порошками из всех лунок с помощью вакуумного аспиратора удаляли содержимое и добавляли в каждую по 100 мкл рабочего раствора МТТ (0,5 мг/мл). Инкубировали 2,5 часа в CO₂-инкубаторе. Затем с помощью вакуумного аспиратора удаляли раствор и добавляли по 100 мкл ДМСО. Инкубировали 15 минут на радиальном шейкере [6].

1.5. Анализ цитотоксичности.

Исследовали в микропланшетном ридере (Alsheng AMR-100, China) адсорбцию каждого образца на длине волны 540 нм (референтная длина волны 750 нм). Жизнеспособность вычисляли по формуле:

$$V_{i(\%)} = \frac{100 * OD_e}{OD_b}$$

где OD_e - значение адсорбции исследуемых образцов, OD_b - среднее значение адсорбции отрицательных контролей [7].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием t-критерия Стьюдента. Достоверными считались различия при уровне значимости $p < 0,05$. Условно нецитотоксичной считалась концентрация вещества, показатель жизнеспособности клеток

после воздействия которой принадлежал интервалу в 70-120%, значение ниже 70% интерпретировалось, как цитотоксическое действие.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка жизнеспособности клеток после воздействия каждого из экстрактов производилась в трех параллелях, после чего по каждой из концентраций выводился средний показатель жизнеспособности, рассчитанный по формуле. Достоверность различия в показателе жизнеспособности между смежными десятичными разведениями, а также минимальным разведением и интактным контролем, оценивалась статистически (Таблица 1).

Таблица 1.

Значимость различий между адсорбцией двух смежных лунок (значимость установленного цитотоксического эффекта в последовательных разведениях и в сравнении с контролем) по Стьюденту

Лунки	1-2	2-3	3-4	4-К	Уровень значимости		
Экстракт василька	11,962	4,723	2,181	3,83	0,05	0,01	0,001
Экстракт дербенника	4,899	6,551	2,574	3,038	<i>t₁ критерий</i>	<i>t₂ критерий</i>	<i>t₃ критерий</i>
Равная смесь экстрактов	9,107	0,065	1,027	3,009	2,776	3,747	8,61

Примечание: интенсивность окрашивания представлена в зависимости от того, какое из табличных критических значений (t_1 - t_3) превышает экспериментальный результат

Достоверно установлена по критерию Стьюдента статистическая значимость различия между наименьшими используемыми концентрациями всех веществ и контролем (при $p < 0,05$ для экстракта дербенника и равной смеси экстрактов, $p < 0,01$ для экстракта василька), что подтверждает наличие собственного цитотоксического эффекта у каждого из экстрактов, включая наименьшие использованные концентрации.

Для спиртового экстракта василька (образец 1) установлено статистически значимое цитотоксическое действие для концентраций 6,25 мг/мл ($p < 0,001$) и 625 мкг/мл ($p < 0,01$).

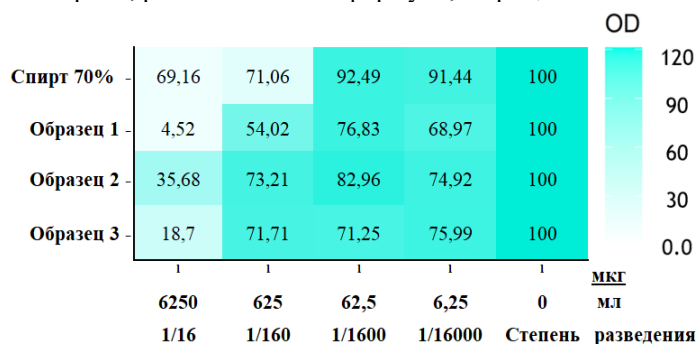
Для спиртового экстракта дербенника (образец 2) установлено статистически значимое цитотоксическое действие для концентрации 6,25 мг/мл ($p < 0,01$).

Для равной смеси спиртовых экстрактов (1:1:1:1) дербенника, василька и двух видов зверобоя – продырявленного и пятнистого, (образец 3) установлено статистически значимое цитотоксическое действие для концентрации 6,25 мг/мл ($p < 0,001$).

Рассчитанные показатели жизнеспособности приведены в таблице (Таблица 2).

Таблица 2.

Средняя жизнеспособность клеток после введения спиртовых экстрактов и разведений экстрагента в качестве контроля, рассчитанная по формуле, в процентах с тепловой картой



Примечание: столбцы с первого по четвертый отражают показатель жизнеспособности в лунках А-Н (1-4), для образца 3 и спирта 70% также две линии лунок А-В (6-9), пятый столбец представляет интактный контроль, для спирта этилового 70% по оси абсцисс указаны значения использованных разведений в каждой из лунок, для образцов экстрактов – концентрации

Для спирта этилового 70% нами было установлено цитотоксическое действие, вызывающее гибель более 30% клеток, только для разведения 1:16 (Таблица 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на использование летучего растворителя в качестве экстрагента, кроме того, обладающего собственной цитотоксичностью, был установлен высокий уровень статистической значимости различий для показателей жизнеспособности, рассчитанных для каждой линии разведений исследуемых экстрактов.

Полученный результат с более низким показателем жизнеспособности клеток для меньшей концентрации экстракта в лунках А-Н (4) и А-В (9) (Таблица 2), не укладываясь в линейную зависимость относительно предыдущих результатов, тем ни менее по уровню значимости различий не является достоверным (Таблица 1), что позволяет им пренебречь при анализе полученных данных.

ВЫВОДЫ

1. Наименьшую сравнительную цитотоксичность продемонстрировал экстракт дербенника, условно нетоксичная концентрация для которого была установлена уже на уровне 625 мкг/мл.

2. Установленный уровень цитотоксического действия для разведений спирта этилового 70% свидетельствует о незначительности влияния экстрагента на показатели цитотоксичности исследуемых спиртовых экстрактов.

3. Оптимальная концентрация, проявившая наименьшую цитотоксичность при наибольшем содержании экстракта, пригодная для дальнейшей разработки состава лекарственного растительного препарата составила 62,5 мкг/мл.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Шматова, Ю.Е. Динамика статистических и социологических показателей состояния психического здоровья населения России / Ю.Е. Шматова // Проблемы развития территории. – 2019. – № 3 (101). – С. 76–96.
2. Российский статистический ежегодник. – 2024 // Стат.сб./Росстат. – Р76 М., 2024 – 630 с. – URL: https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Ejegodnik_2024.pdf (дата обращения: 18.02.2025) – Текст: электронный.
3. Анализ ассортимента российского рынка лекарственных растительных препаратов седативного действия / М. Г. Токарева, Ю.Э. Прожогина, Е.И. Каленикова, М.А. Джавахян // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2019. – № 2(24). – С. 4-19.
4. Ингибирование опухолевого роста в клеточной культуре остеосаркомы с помощью микроРНК miR162a / Д.Ю. Гребнев, И.Ю. Маклакова, Д.О. Корнилов [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2023. – Т. 67, №. 1. – С. 48-55.
5. Сравнительная токсичность некоторых спиртов и кожных антисептиков на их основе / М.В. Бидевкина, О.В. Бакланова, Т.З. Рысина [и др.] // Токсикологический вестник. – 2016. – №2 (137).
6. Исследование цитотоксической и противоопухолевой активности нитрата серебра in vitro и in vivo / А.А. Богданов, Н.А. Верлов, В.В. Клименко [и др.] // Global science. Development and novelty. – 2020. – С. 4-10.
7. Thangaraju, P. ISO 10993: biological evaluation of medical devices / P. Thangaraju, S.B. Varthya // Medical device guidelines and regulations handbook. – Cham: Springer International Publishing, 2022. – 163-187 p.

Сведения об авторах

А.А. Проскуряков* – студент

В.А. Батенева – студентка

В.А. Першуков – студент

Е.А. Шарова – кандидат биологических наук, доцент

О.А. Мельникова – доктор фармацевтических наук, профессор

В.М. Симарзина – лаборант-исследователь

Д.О. Корнилов – лаборант-исследователь

Information about the authors

A.A. Proskuryakov* – Student

V.A. Bateneva – Student

V.A. Pershukov – Student

E.A. Sharova – Candidate of Science (Biology), Associate Professor

O.A. Melnikova – Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor

V.M. Simarzina – Assay Assistant of Laboratory

D.O. Kornilov – Assay Assistant of Laboratory

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

prosk0202@mail.ru