

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( Н И У « Б е л Г У » )

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК  
КАФЕДРА БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ  
НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ**

Выпускная магистерская диссертация  
обучающегося по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология  
очной формы обучения,  
группы 07001644  
Крапивиной Таисии Витальевны

Научный руководитель  
Сиротин А.А.  
Кандидат биологических наук,  
профессор

Рецензент  
Дудникова О. С.  
Старший микробиолог ОКК,  
АО «ВЕРОФАРМ»

БЕЛГОРОД 2018

## **ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1.ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	6
1.1.Безопасность окружающей среды для человека.....	6
1.2.Патогенные микроорганизмы в жизни человека. Наиболее распространённые инфекционные заболевания.....	7
1.3.Лекарственные препараты, в том числе растительного происхождения, в борьбе с патогенными микроорганизмами.....	14
1.4.Пути оптимизации и пролонгирования действия препаратов. Наноструктурирование препаратов.....	26
ГЛАВА 2.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
2.1.Материалы исследований.....	32
2.2.Методы исследования.....	34
2.2.1.Метод наноструктурирования растительных экстрактов.....	34
2.2.2.Методы определения антибактериальной активности.....	38
ГЛАВА 3.РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	49
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	56
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	57
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	63

## ВВЕДЕНИЕ

Экологическая безопасность является одной из важнейших проблем в современном мире и нуждается в создании механизма, который сможет решить эту проблему. Государственный комитет по статистике Российской Федерации показывает постепенное ухудшение в нашей стране окружающей среды, что неблагоприятно может сказаться на здоровье человека. В дальнейшем это может стать причиной экологической катастрофы. С осознанием этого прилагаются усилия в различных направлениях, целью которых являются стабилизация и улучшение здоровья человека и окружающей среды.

Обращая внимание на всю ситуацию в целом, хотелось бы поподробнее остановиться на самых важных обитателях нашей планеты. Микроорганизмы распространены повсеместно. Вся наша планета укутана в живую пленку, большая часть которой приходится на бактерии. Нет места на нашей земле, где не было бы микроорганизмов. Ни сверхнизкие температуры Антарктики, ни кипящие струи гейзеров, ни насыщенные растворы солей в соляных бассейнах, ни сильная инсоляция горных вершин, ни резкие колебания кислотности среды, ни многое другое не мешают микроорганизмам существовать и развиваться в природных субстратах. Все живые существа - растения, животные и люди - постоянно находятся во взаимодействии с микробами, являясь часто не только их носителями, но и распространителями. Горные породы, вода, иловые осадки и почвы также довольно плотно заселены микроорганизмами. Иначе говоря, микроорганизмы - это типичные обитатели - аборигены нашей планеты. Более того, они являются ее первопоселенцами, активно осваивающие самые неподатливые природные субстраты.[24].

Патогенные микроорганизмы представляют собой особый тип болезнетворных микробов. Они проникают не только в людей, но также в клетки и ткани животных. Из-за своих свойств патогенные микроорганизмы

могут ослабить естественную защиту их носителя - его иммунитет. В связи с этим человек становится подвержен другим заболеваниям. Каждый отдельный вид таких микробов вызывает его индивидуальную инфекцию. Заболевания такого рода могут легко передаваться от одного живого организма к другому. Поэтому в повседневной жизни часто называют «заразными». Тяжесть заболевания зависит одновременно от нескольких факторов: патогенности, а также вирулентности микроорганизма, состояния окружающей среды, общего состояния микроба и организма человека.[4]

Наиболее распространенные микроорганизмы:

1. *Yersinia pestis* - возбудитель чумы
2. *Bacillus anthracis* - возбудитель сибирской язвы
3. *Clostridium botulinum* - возбудитель ботулизма
4. *Clostridium tetani* возбудитель – столбняка
5. *Corinebacterium diphtheriae* - возбудитель дифтерии
6. *Helicobacter pylori* - возбудитель гастрита, язвенной болезни желудка и 12-перстной-кишки
7. *Escherichia coli* – возбудитель энтерита и другие.

На сегодняшний день успешное решение проблем демонстрирует стремительно развивающаяся наука - биотехнология. Основными задачами является создание новых лекарственных препаратов, разработка научных основ для создания простых и сложных лекарственных форм, поиск новых методов для фармакологического и биологического контроля над качеством препаратов и сырья различного происхождения. Главными целями являются создание теорий для целенаправленного поиска новых эффективных препаратов с минимумом отрицательного действия на организм, разработка теоретических и рациональных основ комбинирования лекарств и получения многокомпонентных лекарственных форм.[5]

Актуальность работы: В связи с широким распространением бактериальных заболеваний, хронических рецидивов воспалительного характера различной этиологии, иммунодефицитными состояниями, задача

разработки новых лекарственных средств иммуностимулирующего и антибактериального действия является актуальной. В настоящее время перспективным является разработка лекарственных препаратов на основе сухих экстрактов растительного происхождения, с применением нанотехнологий. Это обусловлено большим диапазоном их лечебных свойств, благодаря содержанию комплекса биологически активных веществ, малой токсичностью, широким спектром действия и хорошей переносимостью. При рациональном сочетании растительных экстрактов их терапевтические возможности расширяются.

Цель работы: Исследовать антибактериальную эффективность растительных экстрактов в нативной и наноструктурированной формах.

Задачи:

- Провести литературный обзор
- Подобрать методики для определения биологической активности растительных экстрактов.
- Доказать антибактериальное действие при применении растительных лекарственных препаратов в отношении кишечной палочки.
- Исследовать возможность использования наноструктурированной формы экстрактов, с целью пролонгирования действия и сокращения дозы вещества.

Научная новизна заключается в исследовании антибактериальной активности наноструктурированных экстрактов, так как наноструктурирование – это новый уникальный метод повышения эффективности различных препаратов, в том числе растительных.

## ГЛАВА 1.ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Безопасность окружающей среды для человека

Современные условия существования характеризуются внедрением научно-технического процесса во все среды жизнедеятельности человека. Интенсификация технического прогресса, рост промышленного и сельскохозяйственного производства, потребительское отношение к природным ресурсам приводит к градационным изменениям среды обитания человека. Возрастает количество факторов внешней среды, воздействие которых, негативно сказывается на здоровье человека, что чрезвычайно осложняет взаимоотношения в системе «человек – окружающая среда». В связи с этим охрана окружающей среды является актуальнейшей проблемой современности.[8]

Главный акцент сделан на модернизацию производства и развитие экологически приемлемых производственных методов. Положительное направление деятельности очевидно, однако, ее эффективность сомнительна, так как только за счет технологических инноваций не всегда возможно положительно влиять на состояние здоровья человека и окружающей среды. В связи с тем, что основой экологической безопасности является создать баланс во взаимоотношениях общества с природой, который рассматривается в качестве механизма, должен обеспечивать потребности личности и общества, а также участвовать в интересах сохранения безопасного состояния окружающей среды. Необходимо отметить то, что механизм обеспечения экологической безопасности охватывает широкий диапазон действий, в которых значительная роль должна быть отведена формированию общественного сознания личности в целом и правосознания в частности. Социальное обеспечение и плохие условия окружающей среды зависят в первую очередь от людей. Отношения между обществом и природой не ограничиваются задачами защиты окружающей среды. Благодаря природе человечество активно удовлетворяет свои многочисленные потребности в пище, среде обитания, отдыхе. В своей

деятельности человек обычно не понимает, что нарушает объективные законы и закономерности природных процессов, вызывая нежелательные изменения для себя, и нанося вред окружающей среде. Ускоренное потребление человеком экологического пространства приблизилось к неизбежности столкновения природы и цивилизации. Опасность для окружающей среды порождают соответствующие источники, которые включают в себя: стихийные бедствия, аварии или катастрофы, широко распространенные заболевания у растений, людей или сельскохозяйственных животных, применение современных средств поражения, в результате которых может произойти или уже произошла чрезвычайная ситуация. [1]

## 1.2. Патогенные микроорганизмы в жизни человека. Наиболее распространенные инфекционные заболевания.

Двадцать первый век – век пристального внимания к инфекциям, вызываемым условно-патогенными микроорганизмами. Как известно, по экологическому признаку все микроорганизмы подразделяются на сапрофиты, паразиты и большую группу микробов, обладающих двойственной природой, которые приобрели способность заселять теплокровный организм и вызывать инфекционные процессы, а также сохранили свою способность обитать в окружающей среде. Их принято называть условно-патогенными или потенциально-патогенными микроорганизмами. Выяснилась их важная роль в общей патологии человека, в хронизации инфекционного процесса, а также в способности поражать различные органы и системы, в том числе сердечно-сосудистую, пищеварительную вызывать артериосклероз, приводить к возникновению рака. На протяжении последних лет во всем мире отмечается рост числа заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами. Это, прежде всего, связано: с неблагоприятным воздействием на организм человека антропогенного загрязнения окружающей среды, применением пестицидов, неполноценным и несбалансированным питанием, употреблением генетически модифицированных сельскохозяйственных

продуктов, стрессовыми ситуациями и другими причинами, приводящими к снижению неспецифических факторов защиты. Условно-патогенные микроорганизмы, будучи частью эндо-экологической среды человека (кишечная палочка, грибы рода *Candida*), реже – окружающей среды (легионеллы), проявляют свои патогенные свойства лишь при определенных условиях:

1. большой инфицирующей дозе (при кишечных инфекциях имеет значение быстрое размножение в пищевых продуктах или массивное загрязнение питьевой воды сточными водами)
  2. наличии эндогенных или экзогенных факторов риска заражения человека;
  3. активности механизмов, путей и факторов передачи, которые определяются самим фактом заражения
  4. попадании в организм штаммов микроорганизмов, отличающихся повышенной патогенностью и вирулентностью.
- [9]

В последние десятилетия отмечается возрастание роли условно-патогенных микроорганизмов в инфекционной патологии человека и животных и рост обусловленных ими заболеваний. Эти микроорганизмы часто являются возбудителями внутрибольничных инфекций. Среди условно-патогенных микроорганизмов ведущая роль принадлежит представителям семейства *Enterobacteriaceae*, наиболее распространенными из которых являются роды *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*.

Инфекция – сложный биологический процесс, возникающий в результате проникновения патогенных микробов в организм и нарушения постоянства его внутренней среды.

Возникновение инфекции зависит от нескольких факторов: степени патогенности (вирулентности) микроба, состояния макроорганизма и условий внешней среды. Патогенность – это способность микроба определенного вида



при соответствующих условиях вызывать характерное для негоинфекционное заболевание. К факторам патогенности относятся:

1. Адгезия и колонизация
2. Пенетрация
3. Инвазия
4. Агрессия
5. Способность синтезировать токсины

1. Адгезия и колонизация. Адгезия простыми словами слипание, обеспечивается гликокаликсами клеток и различными физико-химическими механизмами (гидрофобностью, зарядом клеток). На поверхности имеются специальные видоспецифичные рецепторы (адгезины) обеспечивающие способность прикрепляться к эпителиальным клеткам дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта. Бактерии имеют специальные выросты – пили, отвечающие за прикрепление к клеткам хозяина или связыванием патогенных клеток в колонии.

2. Пенетрация – процесс проникновения патогена внутрь эпителиальных клеток, лейкоцитов и лимфоцитов, где клетки вируса размножаются и после сама клетка разрушается.

3. Инвазия обусловлена ферментами, которые ведут к проникновению через слизистые оболочки в близлежащие ткани заражаемого организма.

4. Агрессия—это процесс проникновения, сопровождаемый подавлением иммунной защиты клеток хозяина при помощи агрессивных. Это вещества различного происхождения, которые входят в клеточные стенки патогенных микробов (стафилококк, стрептококк). Они могут подавлять фагоцитоз и миграцию лейкоцитов. Имеется ряд активных ферментов различной белковой природы и неоднородных по своему действию. Патогенность как особое качество болезнетворного вида микроба проявляется в агрессивных его свойствах и в токсическом действии на организм. Токсичность – способность патогенного микроба вырабатывать и

выделять ядовитые вещества, вредно действующие на организм. Токсины бывают двух видов – экзотоксины и эндотоксины.[44]

Экзотоксины – выделяются в окружающую среду при жизни микробов в организме или на искусственных питательных средах, а также в пищевых продуктах. Они очень ядовиты. Например, 0,005 мл жидкого столбнячного токсина или 0,0000001 мл ботулинического токсина убивает морскую свинку.

Микробы, способные образовывать токсины, получили название-токсигенные. Под влиянием нагревания и света экзотоксины легко разрушаются, а под действием некоторых химических веществ теряют токсичность.

Эндотоксины прочно связаны с телом микробной клетки и освобождаются только после ее гибели и разрушения. Они весьма устойчивы при действии высоких температур и не разрушаются даже после нескольких часов кипячения. Ядовитое действие многих бактериальных экзотоксинов связано с ферментами – лецитиназой (разрушает эритроциты), коллагеназой, гиалуронидазой (расщепляет гиалуроновую кислоту) и рядом других ферментов, которые производят в организме разрушение жизненно важных соединений.

В процессе жизнедеятельности патогенные микробы выделяют и другие вещества, обуславливающие их вирулентность.

Вирулентность это значение (мера) патогенности микроорганизма. В зависимости от вида бактерии она различна. Все микроорганизмы принято подразделять на патогенные, непатогенные и условно-патогенные. Первые способны вызывать заболевания вплоть до эпидемии. В естественных условиях вирулентность бактерий повышается путем пассажа через восприимчивый организм, поэтому больных заразной болезнью необходимо немедленно изолировать.

### *Классы (группы) патогенности микроорганизмов*

Всемирная организация здравоохранения предложила вариант классификации микроорганизмов по уровню патогенности, которую рекомендовано использовать только для работы в условиях лаборатории. Ее успешно используют в самой ВОЗ и в развитых западных странах, в том числе в США, Канаде и Японии. Выделены четыре основные группы патогенности микроорганизмов.

Первая группа патогенности. Сюда отнесены бактерии, которые создают невысокую индивидуальную и общественную опасность. Считается, что эта группа микроорганизмов не может вызывать заболевания, или они маловероятны для сотрудников лаборатории и животных. Перечислим наиболее характерных представителей микрофлоры данной категории: *Hafnia alvei*, *Bordetella bronchiseptica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Aerobacter aerogenes*, *E. Coli*, *Photochromogens*, *Scotochromogens*, *Nonphotochromogens*, *Rapid growers*, *Haemophilus influenza*, *Clostridium histolyticum*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Bacteroides* spp., *Klebsiella ozaenae*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Proteus* spp., *Mycobacterium* spp., *Mycoplasma hominis*, *Borrelia* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium septicum*, *Serratia marcescens*, *Flavobacterium meningosepticum*, *Bordetella parapertussis*, *Propionibacterium avidum*, *Citrobacter*, *Clostridium bifermentans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium novyi*, *Eubacterium endocarditidis*, *Staphylococcus* spp..

Вторая группа патогенности. Бактерии, которые могут представлять умеренную индивидуальную и ограниченную общественную опасность. Данные микроорганизмы не представляют особой опасности для жизни и здоровья человека и животных, однако могут вызывать некоторые отдельные заболевания (связано по большей мере с нарушениями иммунитета). Риск распространения патогенов данной категории может быть связан только с отсутствием необходимых средств лечения. При наличии эффективных профилактических методов риск заболеваний ограничен. Примеры

возможных заболеваний: туберкулез, коклюш, холецистит, язвенная болезнь 12-перстной кишки и желудка, ботулизм, столбняк, эризепелоид, возвратный тиф, различные абсцессы, энтерит, гастрит, септецимия, проказа, дифтерия, листериоз, лептоспироз и др. Перечислим представителей, отнесенных к данной группе: *Mycobacterium leprae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Campylobacter jejuni*, *Nocardia asteroides*, *Neisseria meningitidis*, *Borrelia recurrentis*, *Bordetella pertussis*, *Listeria monocytogenes*, *Treponema pallidum*, *Proactinomyces israelii*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A*, *Clostridium tetani*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Campylobacter fetus*, *Leptospira interrogans*, *Shigella* spp, *Mycobacterium bovis*. [17]

Третья группа патогенности микроорганизмов представляет довольно высокую индивидуальную опасность, но низкую общественную. Бактерии данного класса способны вызвать тяжёлые формы заболеваний, однако не способны распространяться от одного организма к другому, поддаются эффективным методам лечения и профилактики, медицинские препараты в данном случае оказывают значительную эффективность. Сюда относятся *Clostridium botulinum*, *Bacillus anthracis*, *Asfarviridae Asfivirus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydomphila psittaci*, *Bovine spongiform encephalopathy*, *Vibrio cholera*, *Flaviviridae*, *Rickettsia typhi*.

Четвертая группа патогенности представляет наибольшую опасность как общественную, так и индивидуальную. Ее представители вызывают тяжелые формы заболеваний, часто не поддающиеся даже глобальному лечению, легко распространяются среди людей и животных, вызывают эпидемии, плохо реагируют на эффективные профилактические меры, обладают высокой вирулентностью и способны к мутагенезу с образованием новых устойчивых форм. Микроорганизмы относятся к следующим семействам: *Yersinia pestis*, *Monkeypox*, *Variolao*, *Arenaviridae*, *Filoviridae*), [62]

### *Пути внедрения патогенных микробов в организм.*

Место проникновения патогенных микробов в организм называется входными воротами инфекции. В естественных условиях заражение происходит через пищеварительный тракт (алиментарный путь), когда в пищу или в воду попадают патогенные микроорганизмы. Болезнетворное начало может проникать через поврежденные, а при некоторых инфекционных болезнях (бруцеллез) и неповрежденные слизистые оболочки рта, носа, глаз, мочеполовых путей и кожу. Судьба патогенных микробов, попавших в организм, может быть различной – в зависимости от состояния организма и вирулентности возбудителя. Некоторые микробы, попав с током крови в определенные органы, оседают (задерживаются) в их тканях, размножаются в них, выделяют токсины и вызывают заболевание. Например, возбудитель туберкулеза в легочной ткани.

Любая инфекционная болезнь, независимо от клинических признаков и локализации микроба в организме, представляет собой заболевание всего организма.

Если патогенные микробы проникли в кровеносные сосуды и начинают размножаться в крови, то они очень быстро проникают во все внутренние органы и ткани. Такую форму инфекции называют септициемией. Она характеризуется быстротой и злокачественностью течения и нередко заканчивается смертельным исходом.

Исключительно большое значение для возникновения инфекционного процесса имеет состояние организма. И.И. Мечников писал: «Болезнь, помимо внешних причин – микробов, обязана своим происхождением еще и внутренним условиям самого организма. Болезнь наступает тогда, когда эти внутренние причины оказываются бессильными помешать развитию болезнетворных микробов».[15]

## 1.2 Лекарственные препараты, в том числе растительного происхождения, в борьбе с патогенными микроорганизмами.

Лекарственных препараты, способны угнетать нежелательное воздействие метаболитов микроорганизма, либо вовсе уничтожить патогенных микроорганизмов.

Лекарственный препарат - вещество или смесь веществ синтетического или природного происхождения в виде лекарственной формы (таблетки, капсулы, растворы, мази и так далее), применяемое для профилактики, диагностики и лечения заболеваний. Перед употреблением в медицинской практике лекарственные средства должны проходить клинические исследования и получать разрешение к применению. По происхождению они делятся на: природные, синтетические, минеральные.

Действие синтетических лекарственных препаратов основано на уничтожении микробов или блокировании их размножения. Далее с остановленной инфекцией справляется иммунная система человека. Не всегда возможно точно установить вид микроорганизма, вызвавшего заболевание. В этих случаях лекарством выбора становятся антимикробные препараты широкого действия, способные справляться с различными видами инфекций. [57]

Антибактериальные медикаменты эффективны в отношении многих видов инфекций. В этом и состоит их основное преимущество – возможность использовать, когда возбудитель заболевания точно не установлен, или имеет место полиинфекция. К недостаткам универсальных препаратов относится то, что они могут уничтожать полезную кишечную микрофлору, вызывая дисбактериоз. Какая бы не была широта охвата антимикробного средства, оно не в состоянии уничтожить все виды болезнетворных микроорганизмов. Одни предназначены в основном для лечения заболеваний дыхательных путей, другие лучше справляются с инфекциями мочеполовой системы. Поэтому при лечении используются те средства, которые наиболее эффективны в отношении определенных систем и органов

человека. Большинство синтетических противомикробных препаратов обладает токсичностью для организма больного, негативно действует на микрофлору желудочно-кишечного тракта и на другие органы, может вызывать некоторые осложнения. Осложнения лекарственной терапии называют по-разному: побочным действием препаратов, лекарственной аллергией, непереносимостью препарата, лекарственной патологией. [60]

Побочное действие препарата - это любая нежелательная реакция, обусловленная фармакологическими свойствами лекарственного средства, которая наблюдается исключительно при применении в дозах, рекомендованных для медицинского применения. Побочная реакция препарата - это совокупность или отдельные проявления негативных свойств лекарственного средства, которые препятствуют его эффективному и безопасному применению у пациента или вызывают негативное влияние на качество его жизни. Побочная реакция является непреднамеренной и вредной для организма реакцией, которая возникает при применении препарата в терапевтических дозах с целью профилактики, лечения, диагностики заболевания, модификации физиологической функции. Прием лекарственного средства всегда связан с определенным риском.

Причины же неизбежного риска при проведении фармакотерапии заключаются в следующем:

- 1) Недостаточная селективность действия лекарственного средства.
- 2) Некоторые эффекты лекарств, желаемые в одной системе организма, могут вызвать нежелательный эффект в других.
- 3) В реализации многих физиологических функций участвуют близкие аналогичные механизмы.
- 4) Длительное воздействие на клеточные механизмы могут привести к постоянным изменениям структуры и функции клеток (в том числе и канцерогенеза).
- 5) Ограниченность информации о патологических процессах. [41]

Больные генетическими болезнями могут пострадать в очень высокой степени, у них может возникнуть непредвиденный иммунный ответ на введение лекарственного вещества.

В связи с этими неприятными, а порой и губительными факторами разработка и внедрение лекарственных препаратов растительного происхождения является одной из важнейших задач в современной фармакологии. Лекарственные растения и препараты из них, выгодно отличаются от своих синтетических аналогов биологическим сродством к тканям организма, малой токсичностью и доступностью, являются ценным сырьем для получения лекарств и лечения различных вирусных и бактериальных заболеваний.[58]

Комбинирование различных видов растительного сырья и использование различных лекарственных форм способствуют повышению эффективности и расширению спектра действия фармацевтической продукции растительного происхождения для лечения различного рода заболеваний. В настоящее время на отечественном фармацевтическом рынке имеется широкий ассортимент лекарственных средств растительного происхождения. Лечебные свойства лекарственных растений зависят от содержания в них действующих веществ, то есть химических веществ, способных оказывать воздействие лечебного характера на организм человека. Они могут находиться либо во всем растении, либо только в отдельных его частях. Количество действующих веществ зависит от фазы развития растения, а также от места произрастания и правильной технологии заготовки и сушки. Поэтому так важно при заготовке лекарственных растений знать, какие их части, в какой фазе развития растения и как именно должны быть собраны и высушены.

Действующие вещества относятся к разнообразным группам органических соединений – алкалоидам, гликозидам, сапонидам, эфирным маслам, органическим кислотам, витаминам, антибиотикам, фитонцидам.



Алкалоиды – органические вещества растительного происхождения, содержащие азот и способные соединяться с различными кислотами, образуя соли. Они дают щелочную реакцию, что и стало причиной такого названия. В большинстве случаев алкалоиды обладают сильным и нередко ядовитым действием на организм, но многие из них имеют очень важное медицинское значение. Алкалоидами являются, например, морфин, атропин, хинин, кофеин, папаверин, стрихнин, пилокарпин, эфедрин, платифиллин, никотин и другие. В алкалоидоносном растении чаще всего встречается несколько алкалоидов. Наиболее богаты алкалоидами растительные семейства маковых, бобовых, лютиковых, пасленовых. Алкалоиды у различных растений находятся в разных частях растений и присутствуют в виде солей органических или неорганических кислот.[19]

Гликозиды – органические вещества растительного происхождения, распадающиеся под действием ферментов на какой-либо сахар (глюкозу, рамнозу) и несхаристую часть – агликон. В чистом виде гликозиды – горькие кристаллические вещества, как правило, растворяющиеся в воде. Характер действия гликозидов на организм определяется химическим строением агликона. Разнообразие строений различных агликонов позволяет применять гликозиды для лечения различных заболеваний. Особенно широко применяются так называемые сердечные гликозиды. Они очень ядовиты и могут применяться только под строгим медицинским контролем. Наиболее ценными гликозидосодержащими растениями являются наперстянка, горицвет, желтушник, толокнянка и другие. Гликозиды, как и алкалоиды, обладают выраженным действием на организм.[56]

Сапонины – гликозиды, образующие при взбалтывании в воде стойкую пену, напоминающую мыльную. Они также распадаются на сахар и агликон, называемый в данном случае сапогенином, химическое строение которого определяет лечебное действие сапониносодержащих растений. Богатые сапонины первоцвет, истод, солодка применяются как отхаркивающие средства, хвощ и почечный чай – как мочегонные, диоскорея – как

антисклеротическое, аралия маньчжурская, женьшень, заманиха и элеутерококк – как стимуляторы центральной нервной системы и адаптогены.

Витамины – вещества с различным химическим строением, играющие важную роль в процессах обмена веществ и необходимые для образования ферментов. Недостаток витаминов в организме приводит к тяжелым заболеваниям (гиповитаминозам и авитаминозам).

В настоящее время известно более 20 различных витаминов; многие из них находятся в лекарственных растениях. Витамины используются медициной не только для профилактики и лечения гипо- и авитаминозов, но и при других самых разнообразных заболеваниях, а также при переутомлении и истощении. Витаминные сборы и отвары часто назначают как общеукрепляющее средство в восстановительном периоде после перенесенных заболеваний, оперативных вмешательств, травм.

Богаты витаминами шиповник, черная смородина, грецкий орех, различные цитрусовые, сосна, первоцвет, облепиха, чеснок, рябина, крапива и многие другие лекарственные растения.

Эфирные масла – очень сложные смеси различных летучих веществ, главным образом терпеноидов и их производных, обладающие специфическими запахами. Они хорошо растворяются в спирте, жирных маслах и других органических растворителях. Вследствие различного химического состава эфирные масла и на организм оказывают различное действие: противомикробное, спазмолитическое, улучшающее работу сердца, болеутоляющее, усиливающее выделение пищеварительных соков. Как эфиромасличные наиболее известны такие растения, как мята, Melissa, шалфей, тмин, душица, тимьян, полынь, роза, анис, ромашка, лимон, мандарин, валериана и другие.[40]

Фитонциды – органические вещества различного химического состава, обладающие выраженным антимикробным действием. Они используются при некоторых инфекционных заболеваниях. При наружном применении

фитонциды действуют как дезинфицирующее средство. В медицине широко используются фитонциды чеснока, лука, эвкалипта и других растений.

Лактоны – вещества, образующиеся из органических кислот. Некоторые из них имеют лекарственное значение. Кумарин, например, повышает чувствительность организма к свету, влияет на состав крови, проявляет противоопухолевую активность.

Горечи – безазотистые горькие вещества. Они способствуют усилению деятельности желудочных желез и применяются для улучшения пищеварения. Много горечи содержат полынь, вахта, одуванчик.

Флавоны – органические соединения гетероциклического ряда. Их производные называются флавоноидами. Флавоны и флавоноиды имеют желтый цвет, плохо или совсем не растворяются в воде. Многие флавоноиды (рутин, кверцетин, гесперидин, цитрин и другие) обладают капилляроукрепляющими свойствами. Они используются при заболеваниях, сопровождающихся нарушением проницаемости стенок кровеносных сосудов (аллергии, инфекции, лучевой болезни). Кроме того, флавоноиды используются при спазмах сосудов, спазмах кишечника, гладкомышечных органов, язвах желудка и двенадцатиперстной кишки, при гепатитах и других болезнях. Флавоны и флавоноиды, как правило, не ядовиты. Они содержатся в спорыше, тёрне и других растениях.[10]

Дубильные вещества или танины – производные многоатомных фенолов, не содержащих азота. Они обладают вяжущим вкусом, не ядовиты, при действии на раневую поверхность и слизистые оболочки оказывают противоболевое и противовоспалительное действие, сужают сосуды и уменьшают выделение влаги и слизи. Дубильные вещества широко применяют в медицине при желудочно-кишечных заболеваниях, воспалениях слизистых оболочек полости рта и других органов, при кожных заболеваниях, ожогах и так далее. Они содержатся в дубе, шалфее, чернике, ромашке, кровохлёбке, зверобое и многих других растениях.

Органические кислоты содержатся в клеточном соке большинства растений в виде солей или в свободном состоянии. Некоторые из них обладают специфическим действием на организм (валериановая, изовалериановая, салициловая, бензойная) и имеют важное лечебное значение. Наиболее распространенные в растительном сырье (яблочная, лимонная, виннокаменная и некоторые другие) органические кислоты при введении их в организм участвуют в процессах обмена веществ и приводят к накоплению щелочей, что бывает важно при некоторых болезнях. Заметные количества органических кислот содержат лимон, клюква, яблоня, смородина, шиповник, облепиха, щавель и многие другие растения.

Пектины – застудневающие межклеточные вещества. Они связывают образовавшиеся в кишечнике или попавшие туда ядовитые продукты, действуют противодиарейно и задерживают размножение некоторых болезнетворных микробов в кишечнике. Пектиновыми веществами богаты яблоки, свекла, клюква, шиповник, апельсин, лимон, черная смородина.[25]

Слизи –безазотистые вещества, различного химического происхождения и состава, преимущественно полисахариды. Они обладают смягчительными и обволакивающими свойствами. Наибольшее количество слизи содержит алтей, который является важным компонентом в грудных сборах.

Смолы – сложные по своему составу, липкие и нерастворимые в воде, обладающие различными запахами вещества. Одни из них оказывают слабительное действие, другие – ранозаживляющее, третьи – мочегонное. Смолы находятся во многих хвойных растениях, березе, зверобое, алоэ.

Жирные масла и жироподобные вещества – сложные эфиры глицерина и высших жирных кислот. Общеизвестны такие жирные масла, как подсолнечное, оливковое, абрикосовое, миндальное и др. Жирные масла в чистом виде используются как лекарственные средства (касторовое, иногда подсолнечное) или же служат растворителями для других лекарственных веществ (например, камфоры) при изготовлении лекарств. К жироподобным

веществам относятся растительные воски, стерины и другие вещества. Растительные стерины, именуемые фитостеринами, довольно широко распространены в растительном мире. Некоторые из них обладают выраженным лечебным действием на организм.[18]

Минеральные соли содержатся в растениях, в них входят химические элементы (калий, фосфор, железо, йод) играющие важную роль в обмене веществ, образовании ферментов и гормонов в организме, а также в кроветворении. Некоторые растения способны к избирательному накоплению минеральных веществ из окружающей среды – в этом случае их возможно использовать при дефиците данного вещества в организме. Так, например, яблоки содержат значительное количество железа в его наиболее легкоусвояемой форме, что может быть использовано для восполнения дефицита железа при железодефицитной анемии.[37]

Ферменты и гормоны – органические вещества белковой природы, играющие большую роль в обмене веществ в организме животных и человека: выполняют роль катализаторов, участвуя в сложных биохимических реакциях. Так, к примеру, соя содержит гормоноподобное вещество, родственное эстрогенам – женским половым гормонам. Поэтому зачастую рекомендуют употребление соевых продуктов женщинам в климактерическом состоянии – для компенсации сниженного синтеза собственных эстрогенов. [49]

В настоящее время интенсивно формируется резистентность к антибиотикам и антисептикам у основных возбудителей внутрибольничных инфекций (госпитальных штаммов стафилококков, энтеробактерий и псевдомонад), увеличивается число антисептических препаратов, к которым обнаруживаются устойчивые варианты микроорганизмов.

Применение растительных средств, в течение многих десятилетий, позволило установить эффективность их использования, выявить широкий спектр действия. На современном фармацевтическом рынке доля отечественных антимикробных препаратов составляет 24% в общей

номенклатуре лекарственных средств, при этом фитопрепаратам в анализируемой группе отводится более 20%. [52]

На данный момент все антибиотические вещества природного происхождения могут быть классифицированы следующим образом:

I. Антимикробные вещества из бактерий вырабатываемые спорообразующими бактериями.

II. Антимикробные вещества из водорослей.

III. Антимикробные вещества из грибов вырабатываемые сумчатыми грибами, базидиальными грибами, несовершенными грибами, лучистыми грибами.

IV. Антимикробные вещества из лишайников

V. Антимикробные вещества высших растений:

1) антимикробные вещества мхов;

2) антимикробные вещества плаунов;

3) антимикробные вещества семенных растений.

Экспериментальные исследования подтверждают, что устойчивость патогенных микроорганизмов к растительным противомикробным средствам не развивается так быстро, как к синтетическим антибактериальным препаратам. К тому же сочетанием нескольких растений с разными биологически активными веществами и введением переменных противомикробных компонентов можно повысить эффективность средства. [13]

Среди широкого спектра всех биологических антисептиков, образующихся в организмах бактерий, плесневых грибов, высших растений и в тканях животных, значительная роль принадлежит открытым Б.П. Токиным в 1928-1930 годах бактерицидам растений – фитонцидам. Фитонцидные свойства присущи как низшим (водоросли, слизевики, грибы, лишайники и бактерии), так и высшим (мхам, папоротникам, хвойным, цветковым) растениям, которые с успехом используются при лечении и профилактике многих воспалительных заболеваний.

Установлена способность выделяемых летучих фракций действовать на бактерии на расстоянии от источника фитонцидов, проявляющих выраженное бактерицидное, бактериостатическое и фунгицидное свойства. Самыми эффективными фитонцидными растениями признаны чеснок, лук, хвойные.

Фитонциды хвойных растений стимулируют фагоцитоз, проявляют бактерицидные свойства плазмы крови, повышают уровень титра лизоцима в сыворотке крови. Изучение препаратов из хвои пихты сибирской показало, что при их длительном ингаляционном применении происходит накопление аскорбиновой кислоты в органах и усиливаются восстановительные процессы в тканях. В настоящее время на основе пихты имеется широкий арсенал препаратов для местного лечения гнойных ран (эфирное масло, мази). Фитонциды обладают saniрующим действием на окружающий воздух, обильно загрязненный, например, гемолитическим стрептококком и коклюшной палочкой.[28]

Высокую активность в отношении патогенных микроорганизмов проявляют эфирные масла. При концентрации в питательной среде 0,1-0,6% эфирных масел полыни Лерха происходит полное подавление роста *S. aureus*. Эфирные масла душицы обыкновенной проявляют широкий спектр антибиотической активности в отношении микрофлоры, вызывающей внутрибольничные инфекции. Экспериментальные препараты из тимьяна Маршалла, ромашки, тысячелистника обыкновенного, подорожника большого, душицы обыкновенной, зверобоя продырявленного, бадана толстолистного высоко эффективны в отношении кишечной палочки.

Растительное сырье, содержащее флавоноиды и фенилпропаноиды (родиола розовая, сирень обыкновенная, эхинацея пурпурная, Melissa лекарственная, анхуза лекарственная, воробейник краснокорневой, табак, расторопша пятнистая, полынь эстрагон (тархун), тополь черный), служит источником для разработки препаратов с антимикробным действием.

Бактерицидные свойства проявляют многие пищевые растения: хрен, горчица, редька, томаты, картофель, морковь, кукуруза, красный перец, сахарная свекла, сельдерей, петрушка, лавр благородный.

Лечебная активность растений обусловлена содержанием в них большого комплекса разнообразных и сложных по своему химическому составу и фармакологическому действию биологически активных веществ, в частности, алкалоидов, гликозидов, полисахаридов, эфирных и жирных масел, органических кислот, витаминов, дубильных веществ, пигментов, аминокислот, флавонов, ферментов. Так, свежий сок листьев алоэ богат ферментами, витаминами, обладает бактерицидным действием на различные группы бактерий, и поэтому находит применение для лечения инфицированных ран. Капуста огородная содержит сахара, гемицеллюлозу, различные витамины (С, Р, В1, В2, В6, К, D), каротин, ферменты, минеральные соли, органически связанную серу, фермент лизоцим, что обеспечивает ей антимикробный эффект.[33]

В настоящее время в Российской Федерации и за рубежом ведется активная работа по изучению лекарственных растений и разработке на их основе препаратов, эффективных в отношении различных возбудителей.

Растения семейства Маковых богаты алкалоидами, обуславливающими антимикробный, антифунгальный эффект. Разработанный в 70-е годы XX века сотрудниками ВИЛАР (Россия) антимикробный препарат «Сангвиритрин» подтвердил свою высокую эффективность в хирургической практике, и в настоящее время широко применяется в Российской Федерации для лечения заболеваний бактериального и грибкового генеза. В основе механизма антимикробного эффекта суммы алкалоидов лежит блокирование бактериальных нуклеаз, нарушение процессов проницаемости клеточной стенки, перегородки деления, структуры нуклеоида.

При определении антимикробной активности фитоэкстракта «Диабифит», состоящего из травы горца птичьего, травы девясила высокого, коры ивы, побегов черники и травы крапивы в отношении музейных



штаммов микроорганизмов было показано, что полиэкстракт обладает бактериостатическим действием по отношению к *Escherichia. coli*, *S. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Противобактериальное действие препарата обусловлено наличием эфирных масел, дубильных веществ, кумаринов, фурукумаринов, полисахаридов.

Методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде показана высокая антимикробная активность препарата «Тантон», содержащего 17 компонентов, в отношении *Staphylococcus.aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Proteus. vulgaris*, *Pseudomonas. aeruginosa*. Благодаря растениям, таким как календула, солодка, астрагал, крапива, бадан, аир, девясил, родиола, левзея, облепиха, шиповник, имбирь, кардамон, перец, петрушка «Тантон» проявлял бактерицидное действие по отношению к *E. coli*, *S. faecalis*, *P. vulgaris* в разведении 1:2, в то время как бактериостатическое по отношению к *P. aeruginosa* – в разведении 1:4, к *S. aureus*, *E. coli*, *S. faecalis* – в разведении 1:8, к *P. vulgaris* – в разведении 1:16.[34]

Бразильскими исследователями установлена фунгицидная, антибактериальная и противовоспалительная активность небольшого декоративного тропического древесного растения *Cassia fistula L.* Лекарственное растение *Clinopodium vulgare L.* используется в болгарской народной медицине как средство с высоким антибактериальным действием по отношению к грамположительной и грамотрицательной микрофлоре, проявляющей множественную лекарственную резистентность.

При исследовании спиртовых экстрактов из высушенных размолотых образцов разных видов растений рода *Eupatorium* (семейство *Asteraceae*), используемых в народной медицине в провинции Энтре Риос (Аргентина), установлена их антимикробная активность в отношении *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans*, *Mucor sp.*, *Asperillus niger*.

Ароматические соединения природного происхождения широко используются в медицине Аюрведа. При исследовании трав *Eugenia*

caryophyllus, Thymus vulgaris, Cinnamomum zeylanium и Cuminum cyminum установлена их высокая антимикробная активность в отношении *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* и *S. enterica serovar typhi*.

Ряд растительных объектов, успешно применявшихся в традиционной тибетской медицине для лечения тяжелых инфекций (трава остролодочника, корни софоры желтоватой, слоевище цетрарии исландской) исследован учеными Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии. Ими разработана рациональная технология экстракционных препаратов «Оксофил», «Софлавин», «Ислацет», обладающих широким спектром антимикробной активности.[48]

#### 1.4 Пути оптимизации и пролонгирования действия препаратов.

##### Наноструктурирование препаратов.

Задача увеличения продолжительности и качества жизни мотивирует интенсивные разработки в области биоматериалов вообще и нанобиоматериалов в частности. Область применения весьма разнообразна:

- хирургический и стоматологический инструментарий
- диагностика, наномоторы и наносенсоры
- фармакология, лекарственные препараты и методы их доставки
- искусственные органы и ткани
- стимулирующие добавки и удобрения

Создание новых систем и средств доставки лекарственных средств сосредоточено на повышении терапевтического эффекта, переносимости и безопасности воздействия лекарственной терапии. Это направление существует параллельно с поиском и синтезом новых субстанций для лекарственных средств. Возможность контролировать процесс доставки и высвобождения лекарственного средства позволяет управлять терапевтическим эффектом, избежать побочных действий, недостаточной эффективности, а также увеличить продолжительность эффекта.[34]

Главной целью поиска новых технологий доставки лекарственного средства является обеспечение контроля процесса поступления лекарственного вещества. [41]

При развитии биотехнологии, разработке новых материалов, нанотехнологии имеют очень хорошие перспективы. Среди наиболее перспективных научных направлений в области биологии и сельского хозяйства эксперты называют воссоздание живой ткани как растительного, так и животного происхождения, получение новых материалов, создаваемых из заданных атомов и молекул. Прогнозируется появление новых открытий в биологии, химии и физике, способных оказать мощное воздействие на развитие цивилизации. Нанобиотехнология занимается биообъектами и биопроцессами на молекулярном и клеточном уровнях. С ее помощью можно решить многие проблемы биологии клетки и в целом сельского хозяйства. Нанобиотехнология открывает широкие возможности в переработке сельскохозяйственной продукции. Для повышения эффективности перерабатываемого сырья и получения новых видов продукции разрабатываются технологии получения пищевых добавок и лекарств методами микроинкапсулирования. В ее основе лежит производство свободнотельных нанопорошков и распыление их в восках. Приготовленные таким образом продукты находят применение как исходное сырье для фармацевтической промышленности и так же при изготовлении продуктов питания. Это могут быть лекарственные вещества, витамины, минералы, сырье, получаемое из растений, или другие специальные продукты, для которых необходимо сохранить вкус и стабильность при хранении. В капсулированном виде они обладают повышенной стабильностью ингредиентов и пониженной реакционной способностью по отношению к другим компонентам, возможностью регулирования скорости выделения действующего вещества от нескольких минут до нескольких часов. Такой способ получения частиц позволяет строго контролировать процессы смешения всех ингредиентов в соответствии с рецептурой и последующей

операцией таблетирования, что очень важно при производстве сложных препаратов.[57]

Нанотехнология как междисциплинарное направление сформировалось в мировой науке и технике в последние 10-15 лет изучает объекты, размер которых составляет примерно 0,1-100 нанометров. Важной составляющей этого научно-технического направления является разработка наноструктурных материалов. Под наноструктурными материалами принято понимать материалы, основные структурные элементы которых не превышают 100 нанометров. В задачу исследований входит установление многообразных связей между свойствами и структурой материалов с выявлением оптимальных наноструктур, что тесно связано с технологией изготовления и последующей эксплуатацией наноструктурных материалов.

Благодаря своим уникальным свойствам на сегодняшний день наноструктурные материалы занимают ведущее положение в современном материаловедении. Методы нанотехнологии позволяют получить принципиально новые устройства и материалы с характеристиками, значительно превосходящими их современный уровень, что весьма важно для стремительного развития многих областей биотехнологии, медицины, охраны окружающей среды.[52]

Среди наноматериалов можно выделить несколько основных разновидностей:

1. Консолидированные наноматериалы
2. Нанополупроводники
3. Нанополимеры
4. Нанобиоматериалы
5. Фуллерены и тубулярные наноструктуры
6. Катализаторы
7. Наноструктурированные лекарственные препараты.

К консолидированным наноматериалам относятся компакты, пленки и покрытия из металлов, сплавов и соединений, полученных методами

порошковой технологии, интенсивной пластической деформации, контролируемой кристаллизации из аморфного состояния. Нанокристаллиты этих материалов находятся не в изолированном или слабосвязанном виде, а консолидированном состоянии. Прочность межзеренных прослоек достаточно высока.

Нанополупроводники, нанополимеры и нанобиоматериалы могут быть как в изолированном, так и частично в консолидированном состоянии, образуя также гибридные материалы.

Нанопористые материалы характеризуются размером пор, как правило, менее 100 нм.

Таким образом, перечисленные виды наноматериалов весьма отличаются как по технологии изготовления, так и по функциональным признакам, их объединяют только характерно малый размер частиц, зерен, трубок, пор, определяющий структуру и свойства.

Широкое применение наночастиц обусловлено рядом их уникальных свойств. Растительные экстракты могут не только быть объектами наноструктурирования, а также они являются биореакторами для синтеза наночастиц. В настоящее время для синтеза металлических наночастиц используют разнообразные химические и физические процессы. Несмотря на широкое распространение это, как правило, дорогостоящие, трудоемкие способы с огромным риском и опасностью для окружающей среды и живых организмов. Таким образом, существует очевидная потребность в альтернативных экономически эффективных, безопасных и экологически чистых методах получения наночастиц. Многие биологические системы, такие как растения, водоросли, бактерии могут превращать ионы неорганических металлов в металлические наночастицы за счет процесса восстановления осуществляемого метаболитами. Производство наночастиц с использованием растений и их экстрактов имеет существенное превосходство перед другими биологическими системами. Низкая стоимость выращивания, безопасность и возможность регуляции необходимого объема

продукции делают растения привлекательной платформой для создания наночастиц. [63]

Применение нанотехнологий в фармации оказалось весьма плодотворным. В течение последних 10–15 лет на основе давно и хорошо известных лекарственных веществ (ЛВ) созданы препараты, обладающие новыми свойствами. Традиционные лекарственные формы не обеспечивают доставку ЛВ внутрь целевых клеток. Эту задачу могут решить наноносители, с помощью которых возможен целенаправленный транспорт ЛВ в орган-мишень или ткань-мишень, что является одним из базовых элементов технологии контролируемого высвобождения ЛВ. При длительной циркуляции наноносителей в кровяном русле содержащееся в них ЛВ защищается от инактивации, а его действие пролонгируется.

В отличие от макро- (например желатиновых) и микрокапсул (размером 10–500 мкм) наноносители предназначены не только для перорального, но и для внутривенного (транспорт к органам-мишеням либо длительная циркуляция в кровяном русле), внутримышечного (депо ЛВ или постепенное поступление наноносителей либо выделяемых ими ЛВ в кровотоки), инъекционного введения. Кроме того, возможно ингаляционное и интраокулярное введение наноносителей, а также интра- и трансдермальная подача ЛВ с помощью наноносителей.

Что же представляют собой наноносители? Они могут быть двух видов. Первый - собственно наночастицы, представляющие монолитные, обычно сферические образования, которые содержат ЛВ по всей массе частицы или только на ее поверхности. Выделение ЛВ из наночастицы происходит постепенно с контролируемой скоростью. К наночастицам относятся также нанокристаллы, состоящие только из ЛВ, подвергнутого измельчению до соответствующих размеров, что позволяет им растворяться со скоростью, превышающей скорость растворения частиц более крупных размеров. Существуют липидные наночастицы (наноэмульсии) — разновидность жировых эмульсий для подачи ЛВ.

Второй вид наноносителей — нанокапсулы. Это полые сферические контейнеры (толщина стенки ~10–30 нм), содержащие жидкую среду, в которой растворено ЛВ. Высвобождение ЛВ происходит за счет диффузии ЛВ через стенку нанокапсулы или в результате ее разрыва. Скорость высвобождения регулируется дизайном нанокапсул и способом их получения.[29]

Взаимодействие наноносителей с клетками зависит от материала, из которого они изготовлены. Наиболее часто используют нанокристаллы ЛВ без дополнительного материала; липиды для получения липидных нанокапсул, то есть липосом, и липидных наночастиц; полимеризованные липиды (полимерные липосомы); термически или химически модифицированный сывороточный альбумин; химически модифицированные полисахариды; биодеструктурирующиеся (распадающиеся в организме постепенно) полимеры. Поскольку нанокапсулы обладают большой удельной поверхностью, их используют, в частности, для доставки труднорастворимых ЛВ. При пероральном введении увеличивается абсолютная биодоступность, уменьшаются индивидуальная вариабельность, зависимость наноносителей от потребленной пищи.[55]

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материалы исследования

Важным признаком выбора растительного сырья явился богатый состав ценных веществ: алкалоидов, сапонинов, кумаринов, флавоноидов, полисахаридов, эфирных масел, которые за счет экстракции переводят в более доступную форму для микроорганизмов, благодаря чему может быть достигнута высокая профилактическая и лечебная эффективности.

В плодах расторопши пятнистой содержатся флаволигнаны, флавоноиды, жирное масло, эфирные масла, стеролы, органические кислоты, горечи, смолы, слизи, сахара, амины, сапонины и другие вещества.

Крапива двудомная (*Urtica dioica* L., семейства *.Urticaceae* – крапивные) – популярное лекарственное растение.

Биохимический состав крапивы:

- Аскорбиновая кислота — в свежих листьях содержится от 177 до 600 мг%, в сухих до 48 мг%.
- Витамин К в количестве 1,5-4 мг%, который участвует в синтезе протромбина, необходимого для свертывания крови.
- Каротиноиды (бетакаротин и ксантофил) — 50 мг%, обладают антиоксидантными и противовоспалительными свойствами. Каратиноиды оказывают влияние на формирование костей и зубов, особенно в детском возрасте. Отмечена их важная роль в стимуляции иммунной системы, в профилактике онкологических заболеваний.
- Каротин - 10-20 мг%, Хлорофилл - 5-8 мг%.
- Хлорофилл - 5-8 мг%.
- Дубильные вещества(танины) обладают выраженным вяжущим, антиоксидантным, радиопротекторным и противовоспалительным действиями. Укрепляют капилляры.



- Флавоноиды - растительные ароматические фенольные соединения, обладают широким спектром действия: кровоостанавливающим, желчегонным, мочегонным, бактерицидным, гипотензивным.
- В корневищах обнаружены стероиды - ситостерин и эргостерин, которые входят в состав применяемых за рубежом экстрактов для лечения аденомы предстательной железы.
- Изопреноиды - природные углеводороды, стимулируют пищеварение и оказывают седативное действие.
- Кумарины - фенольные соединения, проявляющие противоопухолевую и антимикробную активность.
- Органические кислоты (кофейная, яблочная, муравьиная, щавелевая, янтарная) стимулируют секреторную функцию желудка.
- Лигнаны оказывают стимулирующее, противомикробное и гепатозащитное действия.
- Фитоэстрогены обладают гормонорегулирующим действием.[55]

В исследование были включены:

- Тест-объект - *E.coli*
  - 1) номерной штамм
  - 2) обычный штамм
- Исследуемые вещества:
  1. Нативная форма растительного экстракта крапивы (0.5%-ный раствор, 1%-ный раствор)
  2. Наноструктурированный растительный экстракт крапивы в соотношении экстракта к оболочке в определенных концентрациях:
    - а) 1:1(0.5%-ный раствор, 1%-ный раствор)
    - б) 1:2(0.5%-ный раствор, 1%-ный раствор)

- с) 1:3 (0.5%-ный раствор, 1%-ный раствор)
- 3. Нативная форма растительного экстракта расторопши(0.5%-ный раствор, 1%-ный раствор)
- 4. Наноструктурированный растительный экстракт расторопши в соотношении:
  - а) 1:1 (0.5%-ный раствор, 1%-ный раствор)
  - б) 1:2 (0.5%-ный раствор, 1%-ный раствор)
  - с) 1:3 (0.5%-ный раствор, 1%-ный раствор)

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Метод наноструктурирования растительных экстрактов

Из литературы известно, что косвенным доказательством наноразмеров частиц является самоорганизация. Природа полимерной оболочки обуславливает необходимость применения для изучения нанокапсул методов, обладающих минимальным разрушающим воздействием на химические структуры. В качестве этих методов были использованы, т.н. selforganization(самоорганизация), широко используемая в супрамолекулярной химии и метод NTA (метод визуализации и изучения наночастиц в растворах, разработанный компанией Nanosight (Великобритания). В его основе лежит наблюдение за броуновским движением отдельных наночастиц, скорость которого зависит от вязкости и температуры жидкости, а также размера и формы наночастицы. Это позволяет использовать данный принцип для измерения размера наночастиц в коллоидных растворах. В дополнение к размеру, одновременно возможно измерение интенсивности рассеяния света индивидуальной наночастицей, что позволяет дискриминировать наночастицы по их материалу. Третьим измеряемым параметром является концентрация каждой из фракций наночастиц. Очевидным путем повышения биодоступности является уменьшение частиц ингредиента до микро- и наноразмеров. На примере

многих лекарственных веществ было показано, что уменьшение размеров частиц приводит к изменению биодоступности и эффективности.

Самая важная особенность наноструктурированных соединений - это возможность построить огромную рабочую поверхность. Главное их применение - это контролируемое освобождение веществ в определенном месте и времени. На рисунке 1 представлена самоорганизация наноструктурированного сухого экстракта расторопши.[49].

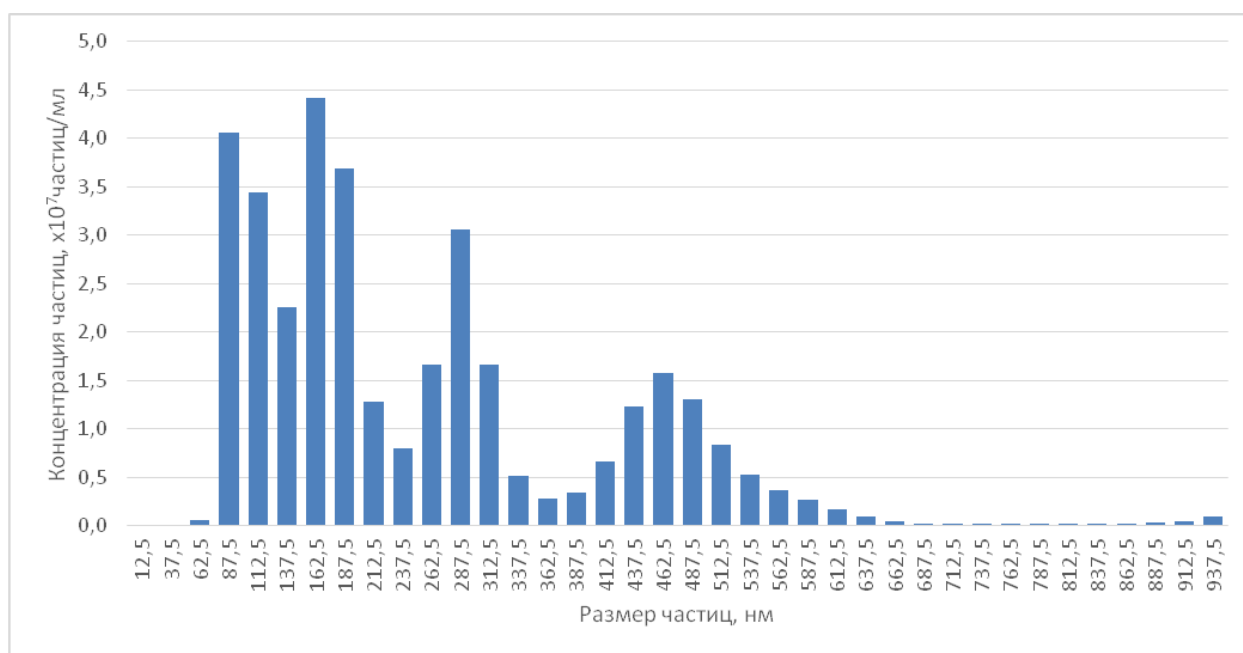


Рис. 1. Распределение частиц по размерам в образце нанокapsул сухого экстракта расторопши в альгинате натрия (соотношение ядро:оболочка 1:1)

Таблица 1.

#### Статистические характеристики распределений

Параметр	Значение
Средний размер, нм	312,7
D10, нм	72,8
D50, нм	191,6
D90, нм	534,1
Коэффициент полидисперсности, $(D90-D10)/D50$	2,407
Общая концентрация частиц, $\times 10^8$ частиц/мл	3,75

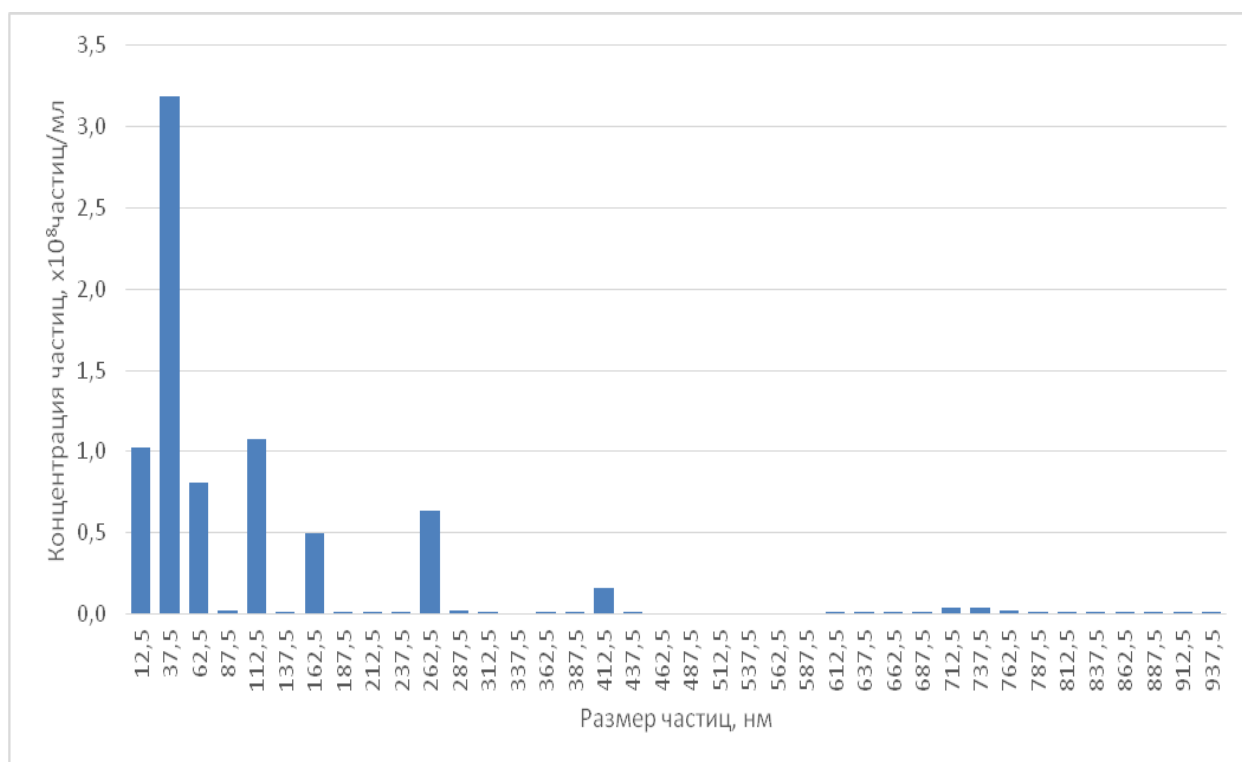


Рис. 2. Распределение частиц по размерам в образце нанокapsул сухого экстракта расторопши в альгинате натрия (соотношение ядро:оболочка 1:2)

Таблица 2.

### Статистические характеристики распределений

Параметр	Значение
Средний размер, нм	110,8
D10, нм	18,7
D50, нм	25
D90, нм	236,6
Коэффициент полидисперсности, (D90-D10)/D50	8,716
Общая концентрация частиц, x10 <sup>8</sup> частиц/мл	7,71

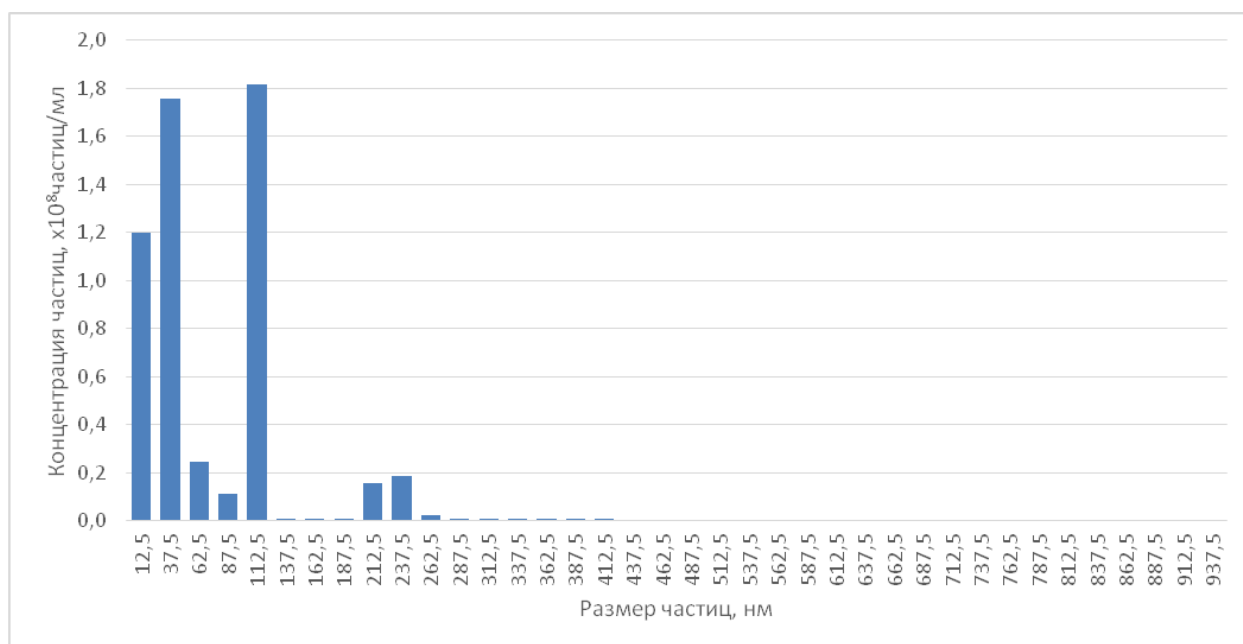


Рис. 3. Распределение частиц по размерам в образце нанокapsул сухого экстракта расторопши в альгинате натрия (соотношение ядро:оболочка 1:3)

Таблица 3

### Статистические характеристики распределений

Параметр	Значение
Средний размер, нм	72,7
D10, нм	11,5
D50, нм	25
D90, нм	97,8
Коэффициент полидисперсности, (D90-D10)/D50	3,452
Общая концентрация частиц, $\times 10^8$ частиц/мл	5,52

## 2.2.2. Методы определения антибактериальной активности

### *Метод диффузии в агар*

Метод диффузии основан на способности антибактериальных веществ диффундировать в толщу агара и вызывать задержку, торможение или подавление роста тест-микроба. (рис. 4) Скорость диффузии растворов антибактериального вещества в агар зависит от природы препарата, состава среды и ее pH.

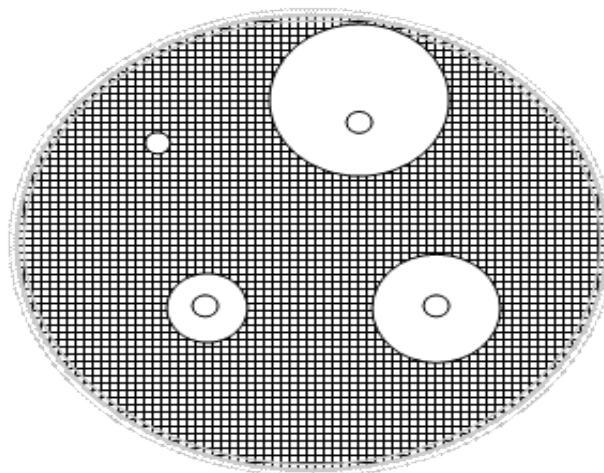


Рис.4. Метод диффузии в агар для определения антибактериального действия исследуемых веществ.

Для получения более точных количественных данных о чувствительности микробов к экстрактам при помощи метода диффузии рекомендуется предварительная диффузия препаратов в агар в течение 20–24 часов.

В настоящее время разработаны и применяются разнообразные методы испытания антибактериальных препаратов при помощи диффузии в агар. К ним относятся: методы лунок, канавок, цилиндриков, блочков, дисков, таблеток и другие.

Метод бумажных дисков. Метод дисков из фильтровальной бумаги для определения активности антибактериальных веществ предложен Лу, Скеллом и Торнбери в 1945 году. Заключается он в том, что стерильные диски фильтровальной бумаги кладут на поверхность агаровой пластинки,

засеянной тест-организмом. Диски смачивают точно дозированным количеством раствора исследуемого вещества или используют диски, пропитанные этими веществами и выпускаемые нашей промышленностью.

В стерильные чашки Петри наливают жидкого питательного агара. Для получения равномерного бактериального газона на поверхность агара в чашку наливают 1 мл взвеси испытуемой культуры. Жидкость равномерно распределяют по поверхности чашки. Избыток жидкости отсасывают пастеровской пипеткой и подсушивают агар в термостате или на рабочем столе при закрытой чашке.

На поверхность засеянного агара на расстоянии двух сантиметров от края чашки и на одинаковом расстоянии друг от друга раскладывают пинцетом по одному бумажные диски с экстрактами. На дне чашки надписывают название экстракта, которым пропитан диск. Чашки выдерживают при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего помещают в термостат на 16-18 часов. Для учета результатов определяют диаметр зоны задержки роста микроба вокруг дисков, пользуясь миллиметровой линейкой, циркулем, миллиметровой бумагой, или же штангенциркулем.

Отсутствие задержки роста микробов указывает на резистентность исследуемого микроба к данному экстракту. Зоны, диаметр которых не превышает 15 миллиметров, свидетельствуют о слабой чувствительности к экстракту. Зоны от 15 до 25 миллиметров встречаются у чувствительных микробов. Высокочувствительные микробы характеризуются зонами с диаметром более 25 миллиметров.

Метод цилиндриков. При этом методе применяют алюминиевые цилиндрики диаметром около 5 миллиметров, длиной около 10 миллиметров, либо стеклянные, нарезанные из трубки и опаянные на пламени с обоих концов. Цилиндрики по трафарету устанавливают на застывшей поверхности агара, засеянного в чашки Петри изучаемыми микробами. Затем наливают в них различные экстракты или разведения одного экстракта. После инкубации

в термостате определяют диаметры зон отсутствия роста тест-организма. Метод цилиндриков можно использовать еще и в такой модификации: в чашку Петри наливают вначале 20 миллилитров агара. После того как агар остынет, на его поверхность наливают еще 5 миллилитров агара, содержащие споры или вегетативные клетки тест-микроба, и легким покачиванием распределяют его равномерно по всей поверхности первого слоя. Через час на поверхность застывшего агара расставляют по трафарету стерильные цилиндрики, а затем вносят в них точно дозированное количество экстракта.

Метод канавок. В стерильные чашки Петри наливают агар и дают ему застыть. Из застывшего агара по диаметру чашки вырезают полоску шириной 1 см. В образовавшуюся канавку наливают расплавленный агар, содержащий определенный процент препарата. Когда агар в канавке застывает, чашки Петри ставят в термостат на 3-4 часа, чтобы произошла диффузия препарата из канавки в окружающую среду.[44].

Культуру бактерий высевают на поверхность агара штрихами, перпендикулярными к канавке и пересекающими всю чашку от края до края включая канавки. Затем чашки Петри помещают в термостат для развития бактерий при оптимальной температуре на 20–24 часа.

Результаты учитывают по интенсивности роста. Устойчивые штаммы растут до самой канавки и даже по ее поверхности. Рост чувствительных к препарату культур задерживается или прекращается на разных расстояниях от канавки в зависимости от степени чувствительности. Это расстояние можно измерить миллиметровой линейкой.

Метод лунок. Агар в чашке Петри засевают испытуемым микробом. При помощи прокаленного сверла для пробок в агаре вырезают несколько лунок, в которые наливают одну-две капли расплавленного и остуженного до 45°C агара для образования дна. Затем в получившиеся углубления помещают различные разведения экстрактов. Чашки ставят в термостат на 20–24 часа. Степень чувствительности испытуемого микроба к



антибактериальному препарату определяют по ширине зоны задержки роста, выражаемой в миллиметрах или по концентрации вещества в том последнем разведении, которое еще в состоянии задерживать рост исследуемых микробов.

Метод агарового блочка. Этот метод, предложенный Егоровым (1957), применяется главным образом для изучения антагонистических взаимоотношений между микробами и заключается в следующем. В чашку Петри наливают 20–25 миллилитров расплавленного питательного агара, пригодного для культивирования антагониста. Когда агар застынет, стерильным пробочным сверлом вырезают из него блочки, которые переносят при помощи стерильного скальпеля в центр других чашек по одному на каждую чашку. Затем заливают чашки с блочками питательной средой, оптимальной для выращивания тест микробов, с таким расчетом, чтобы блочек возвышался над уровнем среды на 1-1,5 миллиметра. Когда агар застынет, чашки необходимо подсушить, чтобы удалить конденсационную воду. Затем поверхность агарового блочка засевают культурой антагониста. Через двое-трое или более суток инкубации по радиусам агаровой пластинки в чашке подсевают штрихами тест-организмы. После соответствующей инкубации в течение 18-20 часов чашки просматривают.

Метод таблеток. Уайтхауз в 1961 году предложил метод определения свойств антибиотиков и других антибактериальных препаратов при помощи таблеток, состоящих на 90% из окислов одного или нескольких металлов: титана, циркония, гафния, тория или церия и на 10% – из целлюлозы. Для связывания вводят немного агар-агара. В таблетки при их изготовлении, добавляют исследуемый образец. Для определения их активности таблетки накладывают на газоны тест-бактерии.

Применение двухслойного агара для испытания антибактериальной активности. В чашку Петри наливают 20 миллилитров агара, на котором хорошо растет испытуемый микроб. Это первый слой. Затем, когда агар застынет, на него наливают 5 миллилитров другого агара, в который

добавлена суспензия бактерий из расчета на 100 миллилитров среды 1 миллилитр бактериальной взвеси, содержащей 1 миллиард бактериальных клеток (второй слой). После того, как застынет второй слой, делают пробойником колодцы, в которые наливают каплями антибактериальный препарат.[50]

В ходе эксперимента были выбраны два метода определения антибактериальной активности растительных экстрактов.

#### *Диско-диффузный метод.*

Принцип диско-диффузного метода (по Keurby-Bauer) основан на феномене ингибиции антибактериальным препаратом (растительным экстрактом) поверхностного, видимого роста микроорганизмов на плотной или жидкой питательной среде. Градиент концентрации культуры в питательной среде создается в результате его диффузии из носителя. Диск с растительным экстрактом помещается на поверхность питательной среды немедленно после посева (инокуляции) культуры исследуемого микроорганизма. При этом практически одновременно начинаются два процесса: диффузия растительного экстракта из диска и рост микроорганизмов на поверхности среды. С практической точки зрения важно то, что от диска к периферии происходит движение «фронта» концентрации экстракта. Особенностью роста микроорганизмов на питательных средах является наличие лаг-фазы – периода времени, в течение которого происходит адаптация культуры к новой среде. По окончании лаг-фазы рост культуры исследуемого микроорганизма начинается в тех областях, где концентрация экстракта еще не превысила минимальную подавляющую. Таким образом, чем длиннее лаг-фаза у данного микроорганизма, тем большим окажется диаметр зоны ингибиции роста вокруг диска с растительным экстрактом.

Диско-диффузный метод в настоящее время стандартизован только для «быстрорастущих» микроорганизмов (формирующих гомогенный сплошной рост – «газон» через 18 - 20 часов инкубации).

Учитывая закономерности зонообразования, очевидно, что для получения с помощью диско-диффузного метода воспроизводимых результатов необходима стандартизация всех этапов исследования.

#### Ход работы:

- Подготовка и стерилизация посуды для проведения эксперимента
- Выбор и приготовление питательной среды, подходящей для активного роста исследуемого образца микроорганизма.
- Подготовка суточной культуры штамма микроорганизма
- Определение концентраций растительных экстрактов для подавления зоны роста кишечной палочки.
- Минимизация интервала времени между инокуляцией микроорганизма и нанесения на поверхность среды дисков, пропитанных растительным экстрактом (двух форм).
- Соблюдение температурного и временного режима инкубации
- Повторность опыта не менее трех раз

Посуда: чашки Петри, колбы конические, круглодонные, стеклянные пробирки, пипетки, петли, шприцы, горелка.

Оборудование: автоклав, термостат, сушильный шкаф, ламинарный бокс.

Для проведения исследования были выбраны две питательные среды. Среда Левина является дифференциально-диагностической средой. Эта среда используется для выделения, подсчета и дифференциации грамотрицательных микроорганизмов кишечной группы.

В коническую колбу наливали 250 мл дистиллированной воды, добавляли 12,5 г среды Левина. Количество среды рассчитывали по пропорции: на 1 л дистиллированной воды требуется 50 г среды Левина. Закрывали колбу пробкой и подогревали на плитке до начала кипения. Автоклавировали среду при температуре 120 °С в течение 20 минут для полного ее приготовления (рис 5).

Мясо-пептонный агар (МПА) – в коническую колбу наливали 250 мл проточной воды, добавляли 12,5 г среды. Постепенно добавляя среду в колбу, медленно помешивали во избежание появления комочков. Среду ставили на автоклавирование при температуре 120 °С в течение 20 минут (рис.6).

Приготовленную и простерилизованную питательную среду разливали под пламенем горелки в заранее подготовленные и простерилизованные чашки Петри (при 170 °С в течении 2 часов).(рис. 7)



Рис. 5. Питательная среда Левина

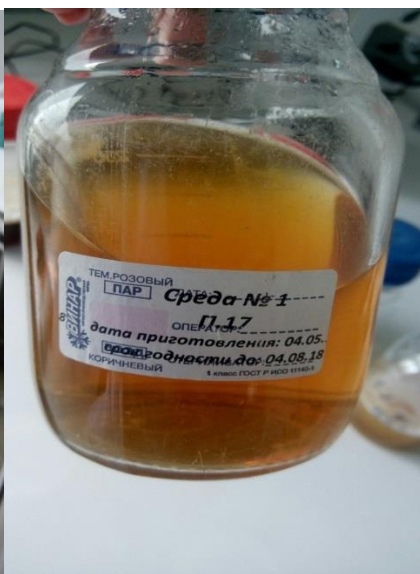


Рис. 6. Питательная среда МПА



Рис. 7 Чашки Петри со средой МПА.

Для приготовления растворов с растительным экстрактом использовали

100 мл дистиллированной воды (заранее проавтоклавированной) и различные массы навесок экстрактов в зависимости от необходимой концентрации:

- 0,1 % - 0,1 г вещества на 100 мл дистиллированной воды
- 0,5 % - 0,5 г вещества на 100 мл дистиллированной воды
- 1 % - 1 г вещества на 100 мл дистиллированной воды

Хорошо взболтали стерильные флаконы (колбы) до полного растворения растительного экстракта (рис. 8,9).

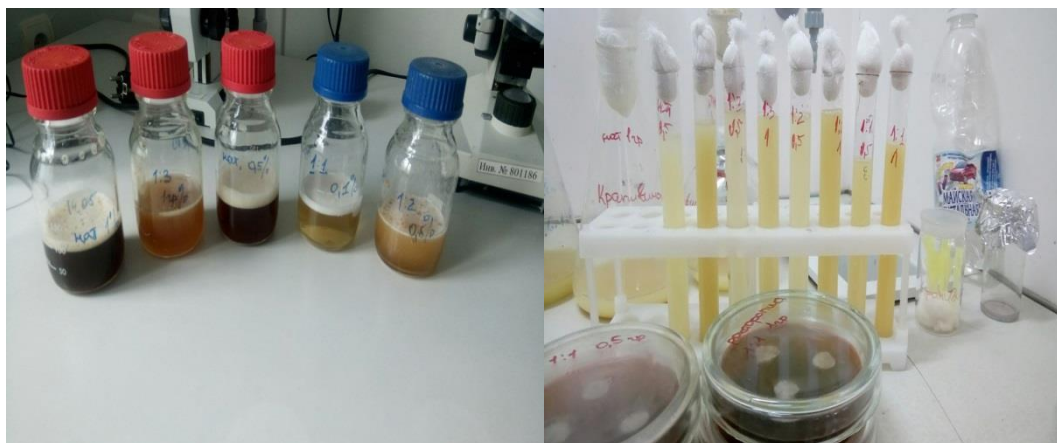


Рис. 8,9. Растворы с растительными экстрактами

Диски вырезали из фильтровальной бумаги диаметром 2 на 2 см. Далее простерилизовали диски в автоклаве при 120 °С в течении 30 минут.. В чашку Петри в условиях асептики наливали 20 мл МПА, на поверхности которого делали засев культуры бактерий с помощью шпателя Дригальского (сплошной газон). На засеянную тест-культурой поверхность помещали стерильные бумажные диски. На каждый диск наносили растительный экстракт в количестве 30 мкл. Чашку Петри помещали в термостат на 24 часа, затем измеряли диаметр зон ингибирования роста тест-культур.

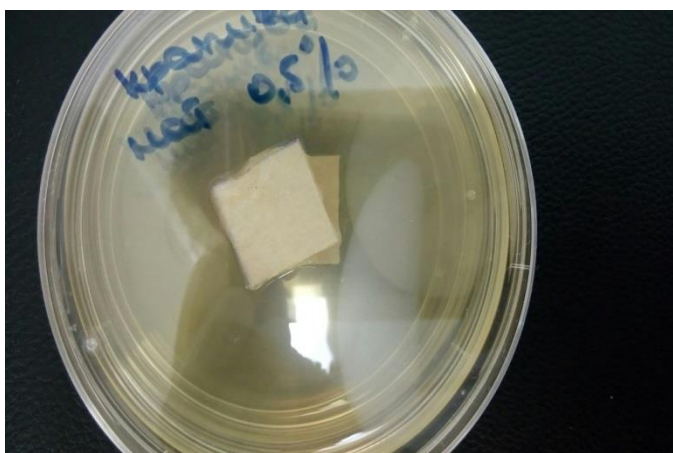


Рис. 10. Диск, пропитанный экстрактом крапивы на засеянной питательной среде  
*Метод лунок.*

Для проведения опыта использовали двухслойный метод. Расплавленную, агаризованную, стерильную питательную среду вносили в количестве 15 мл в стерильную чашку Петри и оставляли до застывания. Поверхность агара в чашке подсушивали.

В пробирку с 4 мл соответствующей расплавленной и охлажденной до температуры  $(42,5 \pm 2,5)$  °С питательной среды вносили 1 мл исследуемого образца микроорганизма (*E.coli*), приготовленного для анализа, быстро перемешивали содержимое пробирки (рис 11).

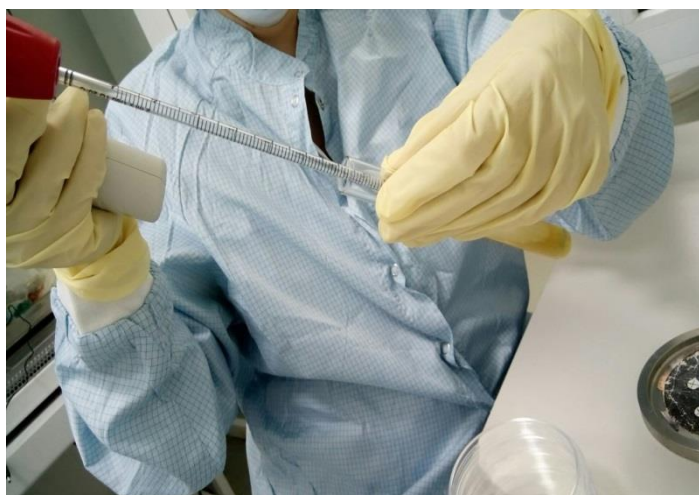


Рис. 11. Внесения инокулята в жидкую питательную среду МПА

Выделение культур осуществляли традиционными методами на питательных средах с последующим определением морфологических и культуральных признаков. Затем содержимое пробирки выливали на поверхность застывшего и подсушенного агара в чашке Петри, равномерно

распределяя верхний слой среды вращательными движениями. После застывания чашку переворачивали и помещали в термостат для инкубации. Питательную среду взяли МПА, так как она является универсальной для выращивания микроорганизмов. Был проведен контроль роста *E.coli* на питательной среде МПА. (рис. 12).



Рис. 12. Контроль образования колоний *E.coli* на питательной среде МПА

Пробочным сверлом или широкой стороной стерильного носика вырезали 6 лунок диаметром 1-2 миллиметра и в нее помещали 0.2 мкл исследуемого растительного экстракта. Чашку выдерживали в холодильнике для диффузии ингибиторных веществ из лунки в толщу агара, далее - в термостате для роста тест-штамма, после чего измеряли зону ингибирования тест-штамма вокруг лунки. Контролем послужил антибиотик Аугментин 0.5 г. Для приготовления раствора брали взвесь в количестве 1 г, 0,5г на 100 мл, который закапывали в лунки по 0.2 мкл. (Рис. 13).

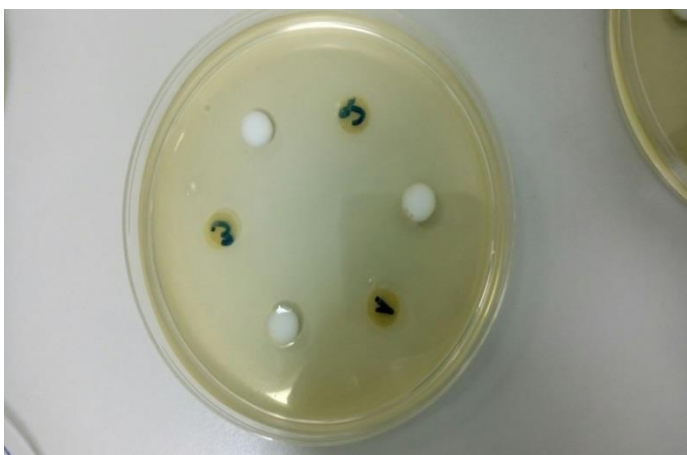


Рис. 13. Лунки, прокапанные растительным экстрактом и антибиотиком



### Статистическая обработка цифровых данных.

Основной задачей статистической обработки является определение достоверности полученных результатов. В любом опыте должно быть достаточное количество вариантов и повторяемостей. Все варианты должны находиться в одинаковых условиях. Не менее важным фактором является определение числа образцов для исследования – оптимизация объема выборки. Статистическую обработку лабораторных данных проводили на персональном компьютере с использованием пакета «Анализ данных» в рамках программы Microsoft Excel.

Для оценки достоверности различий между средними арифметическими использовали параметрический критерий Стьюдента (t). Критерий (t) – это показатель, позволяющий судить о надежности выводов, подтверждающих или опровергающих рабочую гипотезу. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

В проведенном опыте были рассчитаны статистические показатели:

- 1) средние арифметические
- 2) стандартные ошибки
- 3) стандартные отклонения
- 4) критерий Стьюдента (t).

Данные расчеты проводились в программе «Расчет критерия Стьюдента» (рис.14).

Рис. 14 Программа определения коэффициента Стьюдента



### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе эксперимента определялась антибактериальная активность растительных экстрактов расторопши и крапивы в нативной и наноструктурированной формах. Воздействовали на культуру кишечной палочки. Использовали диско-диффузный метод и метод лунок. Диаметр зоны подавления роста замерялся миллиметровой линейкой и штангенциркулем (в некоторых опытах). Зона ингибирования возле каждого диска замерялась не менее, чем в 3-х местах. Полученные результаты заносились в приведенные ниже таблицы и диаграммы.

Таблица 4.

#### Антибактериальная активность экстракта крапивы

№ опыта	Форма экстракта	Концентрация	Соотношение экстракта к оболочке	Зона задержки роста, мм (24 часа инкубации) Ср. арифм.
1	Нативная	1%, 0.5 %	-	0
2	Наноструктурированная	1%, 0.5 %	1:1	0
3	Наноструктурированная	1%, .5 %	1:2	0
4	Наноструктурированная	1%, 0.5 %	1:3	0
5	Антибиотик Аугментин (контроль)	1%	-	30,888±0,1
6	Антибиотик Аугментин (контроль)	0.5 %	-	28,666±0,3

Антибактериальную активность растительных экстрактов определяли методом лунок. Из таблицы 4 видно, что ни в одном варианте, где использовался растительный экстракт, не была обнаружена зона угнетения роста кишечной палочки. Отрицательный результат возможен из-за высокой

концентрации *E.coli*( $10^3$ )или недостаточной эффективности применения данного метода. ( $10^3$ ). За контроль был взят антибиотик Аугментин в таких же концентрациях, как и экстракты, так как ни одна из форм растительных экстрактов не дала никаких положительных результатов.(рис. 15)

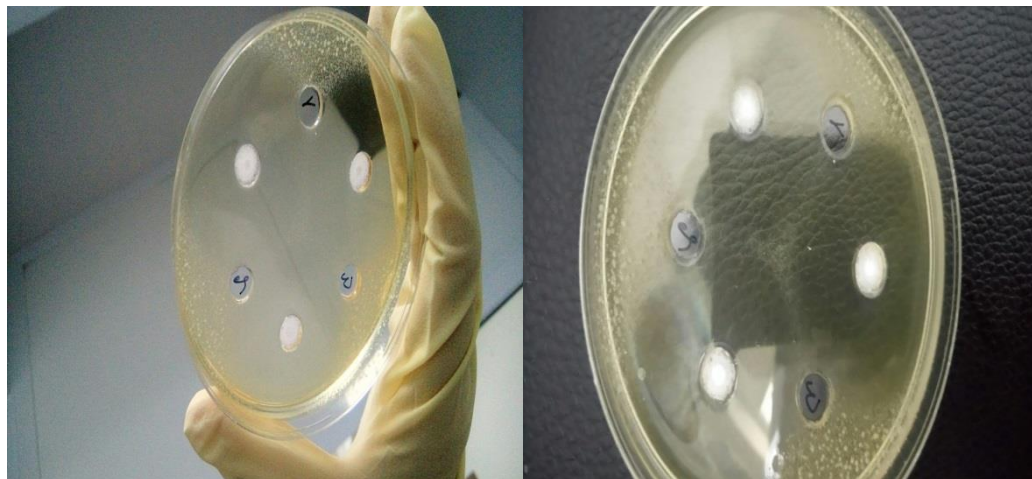


Рис. 15 Антимикробное действие антибиотика по сравнению с нативной формой экстракта крапивы крапивы в наноструктурированной форме. Рис. 16. Разница зон подавления роста *E. coli* между антибиотиком и экстрактом

Таблица 5.

#### Антибактериальная активность экстракта крапивы

№	Форма экстракта	Концентрация, %	Соотношение экстракта к оболочке	Зона задержки роста. Среднее значение, мм	
				12 часов инкубации	24 часа инкубации
1	Нативная(контроль)	0,5	-	3,1±0,02	1±0,02
		1		3,8±0,04	2,3±0,04
2	Наноструктурированная	0,5	1:1	3,6±0,85	3,5±0,9
		1		4,3±0,6*	4.3±0,7
3	Наноструктурированная	0,5	1:2	3,3±0,4	3,2±0,8
		1		4,2±0,76*	4,0±0,6
4	Наноструктурированная	0,5	1:3	2,8±0,8	2,5±0,6
		1		3,0±0,5	2,8±0,9
5	Антибиотик Аугментин (контроль)	0,5	-	28,1±0,5	30,7±0,7
		1		31,3±0,5	32,6±0,5

В данном эксперименте был использован метод дисков. Как видно из данных таблицы 5, растительные экстракты в обеих формах имеют небольшую антибактериальную активность в отношении кишечной палочки.

Минимальная активность проявилась в варианте, с использование нативной формы экстракта -1 мм ,максимальная активность проявилась в опыте, с использованием наноструктурированного экстракта – 4,3 мм.).

Сравнительный анализ эффективности метода лунок и диско-диффузного показал, недостаточную чувствительность первого, так как достоверность разницы между вариантами, достигнутыми при диско-диффузном методе, оказалась недостаточной при методе лунок.

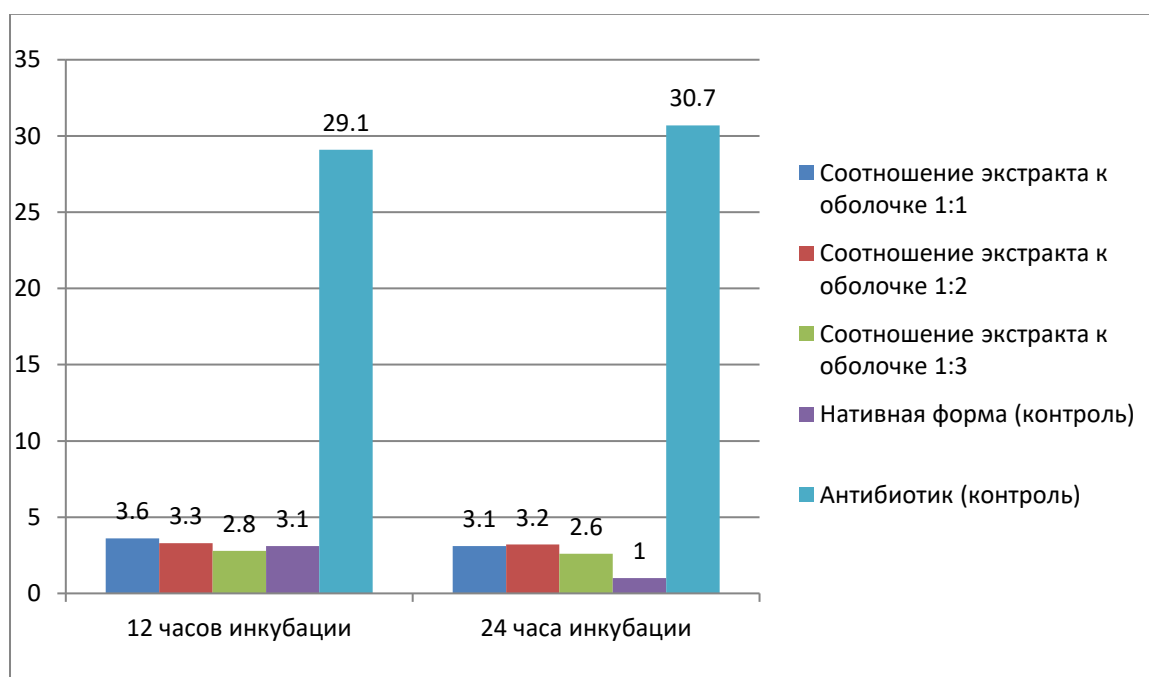


Рис. 17 Антимикробное действие экстракта крапивы 0,5 %

Исходя из данных, изображенных на рис. 17 наибольшая эффективность подавления роста кишечной палочки наблюдается у экстракта в наноструктурированной форме (1:1) при 12-часовой инкубации, наименьшая эффективность прослеживается с применением экстракта в нативной форме при 24-часовой инкубации.

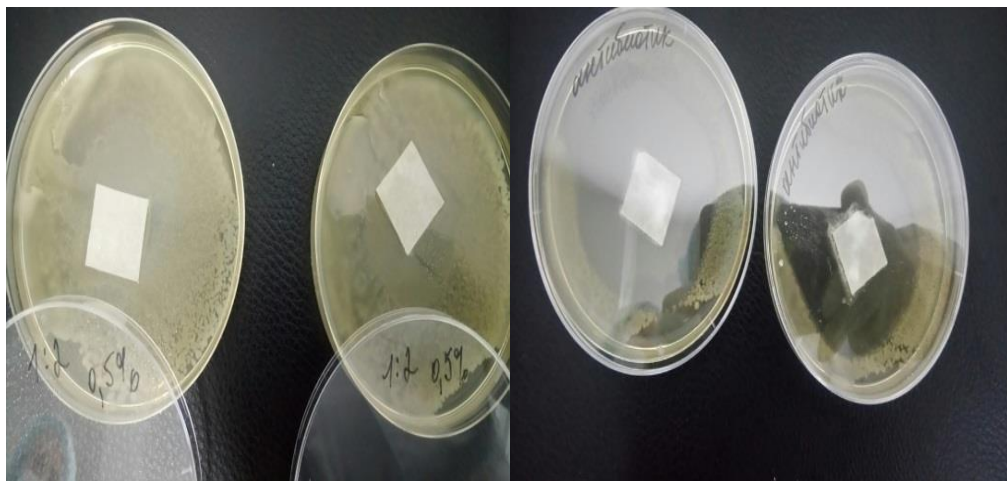


Рис. 18. Антибактериальная активность экстракта крапивы в соотношении 1:2 с концентрацией 0,5%

Рис. 19. Антимикробное действие антибиотика

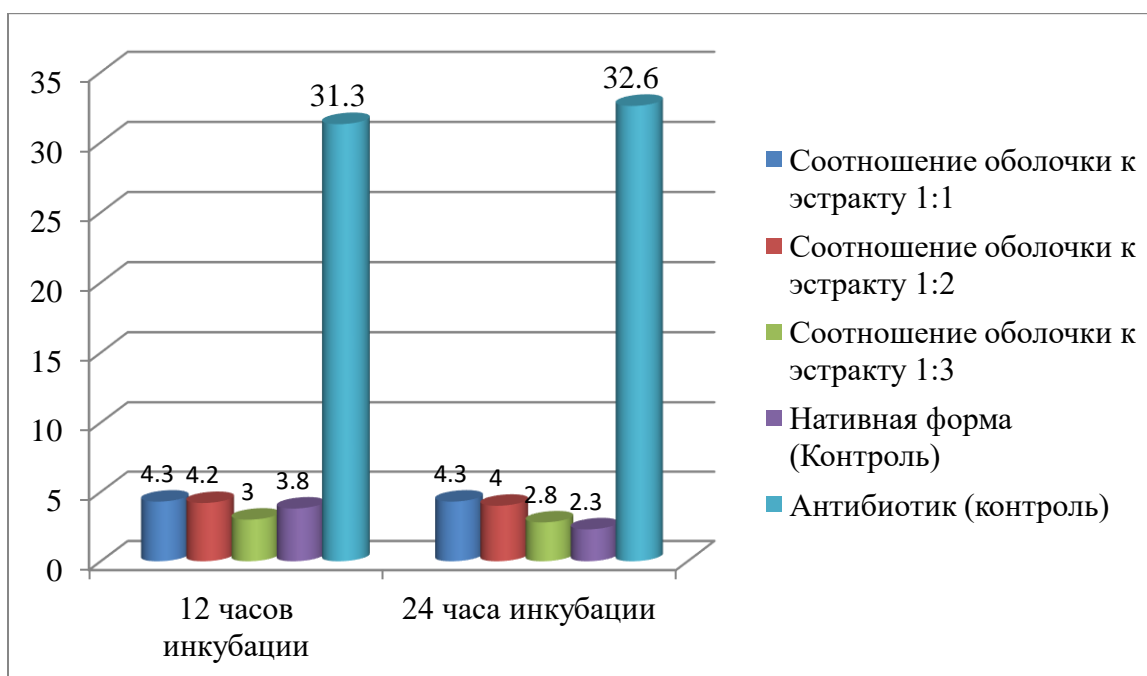


Рис.20 Антимикробное действие экстракта крапивы 1 %

Анализ диаграммы (рис. 20) показывает, что увеличение концентрации способствует образованию больших зон угнетения роста *E.coli*.

Таблица 6

## Антибактериальная активность экстракта расторопши

№	Форма экстракта	Концентрация, %	Соотношение экстракта к оболочке	Зона задержки роста. Среднее значение, мм	
				12 часов инкубации	24 часа инкубации
1	Нативная(контроль)	0,5	-	11,3±0,8	4,5±0,6
		1		13,2±0,6	3,8±0,5
2	Наноструктурированная	0,5	1:1	10,5±0,5	10,1±0,9
		1		12,5±0,7	11,8±0,6
3	Наноструктурированная	0,5	1:2	8,6±0,5	8,3±0,5
		1		9,3±0,7	9,2±0,8
4	Наноструктурированная	0,5	1:3	7,4±0,5	7,2±0,9
		1		8,3±0,8	8,2±0,7

Для определения антибактериальной активности использовали диско-диффузный метод. Результаты представлены в таблице 6. По критерию Стьюдента, при уровне значимости  $p \leq 0,05$ , все полученные данные достоверно отличаются от контроля.

Экстракт расторопши обладает явным антимикробным эффектом в отношении *E.coli*. Это может быть связано с наличием в плодах расторопши фитонцидов, флавоноидов, эфирных масел и жирных масел. Также как и в опыте с экстрактами крапивы, экстракты в наноструктурированной форме дают более длительное воздействие в отличие от нативных форм.

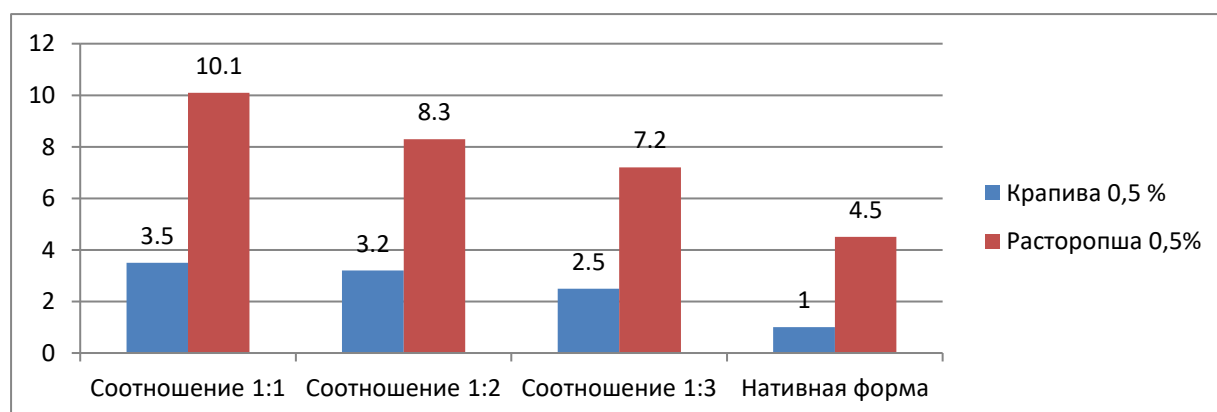


Рис.21 Сравнительный анализ зон задержки роста крапивы и расторопши при 0,5%-ной концентрации (24 часа инкубации).

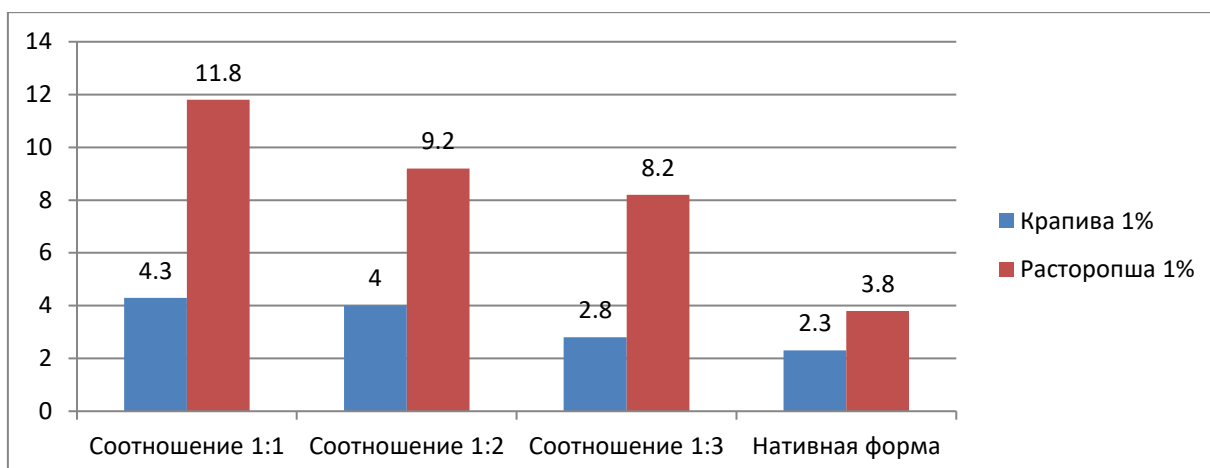


Рис.22 Сравнительный анализ зон задержки роста крапивы и расторопши при 1%-ной концентрации (24 часа инкубации).

Согласно полученным результатам наибольшую биологическую активность в отношении *E.coli* проявил наноструктурированный растительный экстракт расторопши в соотношении 1:1 при 1%-ной концентрации.

Сравнительный анализ, представленный на рисунках 21 и 22, показывает, что антибактериальное действие экстракта расторопши при уровне значимости  $p \leq 0,05$  достоверно отличается от действия экстракта крапивы. Это может быть связано с наличием в экстракте расторопши сильно воздействующих на кишечную палочку биологически активных веществ, обладающих антимикробным действием. В литературных источниках нет данных о антибактериальных свойствах расторопши. Вследствие чего, данные, представленные в нашем исследовании, получены впервые.

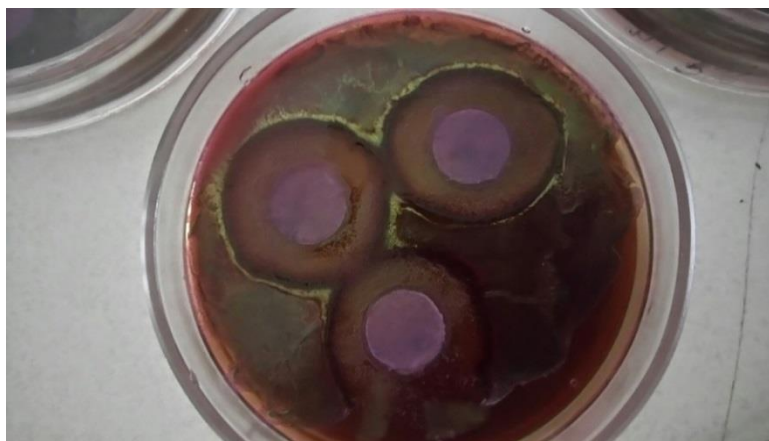


Рис. 23. Действие наноструктурированного экстракта расторопши в соотношении 1:1 при 1 %-ной концентрации.

Увеличение концентрации экстракта расторопши (рис. 23) дает более сильное воздействие на подавление роста *E. Coli*. На рис. 23 видно, что на краях образования зон задержки роста большее скопление колоний микроорганизма это связано с низкой концентрацией наноструктурированного экстракта расторопши, ввиду снижения диффузии от центра, к периферии зоны задержки роста, что видимо оказывает благоприятное воздействие на активацию метаболических путей *E. Coli*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В докладе от 20 сентября 2017 года, выпущенном ВОЗ, говорится, что сегодня в мире существует проблема разработки новых антибактериальных средств. И один из важнейших аспектов – недостаток инноваций.

Применение синтетических антибактериальных препаратов вызывает ряд вопросов и сложностей, связанных с выработкой устойчивости у патогенных микроорганизмов, а также проявлением побочных действий и аллергических реакций. Вследствие чего необходимость введения на фармацевтический рынок препаратов из растительного сырья с применением нанотехнологий является одним из важнейших аспектов в современной медицине. Проведенное нами исследование подтверждает возможность применения растительных экстрактов в отношении кишечной палочки и позволяет сделать следующие выводы:

1. Данные, представленные в литературных источниках, не дают полного представления о применении наноструктурированных форм растительных экстрактов, что говорит о необходимости продолжения данного исследования.
2. Подобранные методики определения биологической активности растительных экстрактов апробированы на угнетении роста *Escherichiacoli*.
3. Установлено что, экстракты крапивы и расторопши в нативной и наноструктурированной формах обладают антимикробным воздействием на рост *Escherichiacoli*.
4. Уменьшение концентрации доз вещества понижает эффективность воздействия растительного экстракта на исследуемый штамм микроорганизма.
5. Сравнительная характеристика зон ингибирования роста кишечной палочки, в зависимости от времени инкубации, доказывает целесообразность применения именно наноструктурированных форм, с целью пролонгирования действия основного действующего вещества.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авраменко, И.Ф. Микробиология: учеб. пособие. - М.: Колос, 1972. – 190 с.
2. Андрус Д. и др. Введение в химию окружающей среды. М.: Мир, 2000. – 45-49 с.
3. Аничков С.В., Беленький М.Л. Учебник фармакологии. - МЕДГИЗ ленинградское объединение, 1955. – 29 с.
4. Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С., Лепяхин В.К. Клиническая фармакология и фармакотерапия: Руководство для врачей. - М.: Универсум, 1993. – 398 с.
5. Багинская А.И., Колхир, Тареева Н.В., Давыдова В.Н., Охотникова В.Ф., Качалина Т.В., Сокольская Т. А. «Разработка лекарственных препаратов на основе комплексного использования плодов расторопши пятнистой// П Российский нац. Конгресс «Человек и лекарство», тезисы докладов, Москва, 1995. – 623 с.
6. Бондарь Н.В., Михненко И.Ю., Меньшова Н.И. Опасность загрязнения атмосферного воздуха автомобильными выбросами для здоровья человека. Сборник «Физическая культура и спорт в современном социуме. – Орел., 2014. – с 256
7. Багинская А.И., Колхир, Тареева Н.В., Давыдова В.Н., Охотникова В.Ф., Качалина Т.В., Сокольская Т. А. «Разработка лекарственных препаратов на основе комплексного использования плодов расторопши пятнистой// П Российский нац. Конгресс «Человек и лекарство», тезисы докладов, Москва, 1995 г. – с. 623.
8. Верлан, Н.В. Проведение мониторинга безопасности лекарственных средств / Н.В. Верлан, Е.О. Кочкина, Н.А. Двойникова, М.В. Рыбалко, А.В. Попадюк // Вестник Бурятского государственного университета. Серия: Медицина, фармация, 2014. – 13-16 с.
9. Винчестер А. Основы современной биологии: пер. с англ. - М.: Мир, 1967. – 328 с.

10. Глызин В.И., Толстых Л.П., Давыдова В.Н., Тареева Н.В. «Сухие экстракты из лекарственного растительного сырья». Тезисы науч. докл.
11. Горбунова Т.А. Лечение растениями. - М.: Аргументы и факты, 1994
12. Горячкина Л., Ещанов Т., Коган В. и др. Когда лекарство приносит вред. - М.: Знание, 1980. - 20 с.
13. Демецкая А. Нанотехнологии в медицине и фармации // Фармацевт практик - 2007. - № 10. - 66-69 с.
14. Егорова М.С., Голещихина А.А. Экологическая безопасность. Экология личного пространства человека // Молодой ученый. — 2015. - № 7. - 1060-1062 с.
15. Еркенова М.Н., Мурзахметова М.К., Аралбаева А.Н. Исследование антимикробных и антиоксидантных свойств растительных экстрактов // Студенческий: электрон. научн. журн. - 2017. № 1(1).
16. Каркищенко Н.Н. Клиническая и экологическая фармакология в терминах и понятиях: Тезаурус. - М.: ИМР-Медицина, 1995. - 304 с.
17. Каркищенко Н.Н. Фармакологические основы терапии (руководство и справочник для врачей и студентов). - М.: ИМР - Медицина, 1996. - 560 с.
18. Катцунг Б.Г. Базисная и клиническая фармакология: в 2-х томах/пер. с англ. - М.-СПб.: Бином-Невский Диалект, 1998. - Т.1 - 612 с. - Т.2 - 670 с.
19. Кемпинскас В.В. Лекарство и человек - победы, надежды, опасности, поражения. - М.: Знание, 1984. - 96 с.
20. Комплексная гомеопатия - рациональная терапия: практическое руководство // под ред. И.В. Михайлова. - М.: СТАР Ко. - 1997. - 287 с.
21. Коротяев, А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: Учебник для медицинских вузов / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. - СПб.: СпецЛит, 2012. - 760 с.
22. Крылов Ю.Ф., Бобырев В.М. Фармакология. - М.: ВХНМЦ МЗ РФ, 1999. - 352 с.

23. Крылов Ю.Ф., Смирнов П.А. Путешествие в мир фармакологии. - М., 1988
24. Крылов Ю.Ф., Смирнов П.А. Удивительный мир лекарств. - М.: Знание, 1985. - 144 с.
25. Кудрин А.Н. Лекарства не только лечат...". - М.: Знание, 1971
26. Кудрин А.Н., Скакун Н.П. Фармакогенетика и лекарства: серия "Медицина". - М.: Знание, 1975
27. Кукес В.Г. Клиническая фармакология: Уч./Научн. ред. Байчурина А.З. - 2-е изд. - М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. - 528 с.
28. Лакин К.М., Крылов Ю.Ф. Лекарства, яды и организм. М.: Знание, 1974. - 96 с.
29. Лоуренс Д.Р., Бенитт П.Н. Клиническая фармакология: в 2-х томах/пер. с англ. - М.: Медицина, 1991
30. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2-х томах - 13-е изд. - Харьков: Торсинг, 2001. - 56-59 с.
31. Михайлов И.В. Современные фитотерапевтические препараты: справочник. - М.: СТАР Ко, 1997. - 187-189 с.
32. Махлаюк В.П. Лекарственные растения в народной медицине. - Саратов, 1967. - 559 с.
33. Назарова, Г.Н. Изучение противомикробных свойств некоторых биологически активных веществ растений /Г.Н. Назарова // Эколого-биологические проблемы бассейна Каспийского моря: Материалы VIII Междунар. науч. конф. АГПУ – Астрахань: Изд-во АГУ, 2005. - 72-73 с.
34. Нил М. Наглядная фармакология/пер. с англ. - М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. - 103 с.
35. Новиков Д.К., Генералов И.И., Железняк Н.В., Окулич В.К. Медицинская иммунология. - Минск - Витебск, 1998. - 148 с.

- 36.Оганов Р.Г., Поздняков Ю.М. Десять шагов к здоровому питанию: Методическое пособие для врачей общей практики. - М.: ЦПФС "Единение", 2000. – 16 с.
- 37.Перкова Е. С., Сборы как альтернатива синтетическим лекарственным препаратам. Номер: 10-4 (26) 2017. – 112-113 с.
- 38.Плейфэр Дж. Наглядная иммунология/пер. с англ. - М.: ГЭОТАР Медицина, 2006. - 95 с.
- 39.Плешков Б.П. Биохимия сельскохозяйственных растений. М.: Колос, 1980. – 495 с.
- 40.Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. М.: Колос, 1985.-255 с.
- 41.Покровский В.И Краткая медицинская энциклопедия: в 2-х т./под ред. В.И. Покровского. - 3-е изд. - М.: НПО "Медицинская энциклопедия", Крон-Пресс,2000. – 66 с.
- 42.Попова Н.В., Литвиненко В.И. Лекарственные растения мировой флоры // Харьков: СПДФЛ, 2008. 143–144 с.
- 43.Покровский В.И Популярная медицинская энциклопедия. Гл. ред. В.И. Покровский. - 5-е изд. - М.: "Издательский Дом Оникс", Альянс, 1998. – 688 с.
- 44.Прозоровский В.Б. Домашняя аптечка. - М.: медицина, 1989 – 160 с.
- 45.Прозоровский В.Б. Рассказы о лекарствах. - Медицина, 1986. – 144 с.
- 46.Пронченко Г.Е. Лекарственные растительные средства, 2002. –285 с.
- 47.Регистр лекарственных средств России: Энциклопедия лекарств/гл. ред. Крылов Ю.Ф. Ред. кол.: Вышковский Г.Л. (зам. гл. ред.) и др. – 7-е изд. – М.: РЛС-2000, 1999. – 1519 с.
- 48.Ривкин В.Л. Медицинский толковый словарь. - М.: Медпрактика, 2001. – 208 с.
- 49.Рисман М.Н. Биологически активные пищевые добавки: Неизвестное об известном/пер. с англ. – М.: Арт-Бизнес-Центр, 1998. – 489 с.

50. Самылина И.А., Ермакова В.А., Сорокина А.А., Сапронова Н.Н., Бобкова Н.В. Фармакологические исследования сырья и лекарственных средств крапивы двудомной. // Разработка и внедрение новых методов и средств традиционной медицины. Научные труды Центра традиционной медицины и гомеопатии, т.2, - М., 2001. – 126-129 с.
51. Сухенко Л.Т. Эколого-микробиологические исследования бактерицидных свойств некоторых растений Астраханской флоры /Л.Т. Сухенко, Г.Н. Генатуллина, Н.В. Бовин, М.В. Белякова // Материалы VI Всерос. науч. конф. Астрахань: Изд-во АГУ, 2003. – 153-156 с.
52. Сокольская, Т.А. Создание лекарственных средств из плодов расторопши пятнистой (получение, стандартизация и контроль качества): дис. на соискание уч. степ. доктора фарм. наук: 15.00.02 / Т.А. Сокольская; Моск. мед. академ. им. И.М. Сеченова. – Москва, 2000. – 79 с.
53. Сухенко, Л.Т. Особенности взаимодействия некоторых биологически активных веществ растений и бактерий /Л.Т. Сухенко, Г.Н. Назарова, М.А. Егоров, А.М. Имашева// Актуальные природопользования: Тез. докл. Междунар. научно-практической конф. – Ставрополь, 2005. – 244 – 245 с.
54. Тулянкин В.Ф., Тулянкина Т.И. → Издательство: Реперт ВТ-Домашний доктор. Народная библиотека. - М., 1997, – 49-51 с.
55. Харлампович Т.А. Фитохимическое изучение и стандартизация донника лекарственного травы, произрастающей на территории Алтайского края // Автореф. дисс. ... канд. фарм. наук. Пермь, 2014. – 22 с.
56. Щемелинина Т.В., Сорокина А.А. Содержание аскорбиновой и органических кислот в траве донника лекарственного // Фармация, 2015. № 2. – 22-24 с.
57. Щемелинина Т.В., Сорокина А.А. Изучение гидрофильной фракции биологически активных веществ донника лекарственного // «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования.

- Создание новых физиологически активных веществ». Материалы конференции, Воронеж, 2016. – 208-210 с.
58. Шульпекова Ю.О. Флавоноиды расторопши пятнистой // Русский медицинский журнал, 2004. – Т.12, № 5. – 248–251 с.
59. Alasbahi R.H., Satiyeva S., Craker L.E. // *J. Herbs, Species & Med. Plants.* 1999. V. 6. < 3. P. 75–83.
60. Blaeser P., Steiner U. // *Modern Fungicides and Antifungal Compounds II* / Eds. H. Lyr, P. E. Russel, H.-W. Dehne, H. D. Sisler. Andover: Intercept, 1999. P. 491–499.
61. Feresin G.E., Tapia A.A., Bustos D.A. // *Fitoterapia.* 2000. V. 71. < 4. P. 429–432.
62. Herger G., Klingauf F. // *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.* 1990. V. 55. < 3a. P. 1007–1014.
63. Serkedjieva J., Hay A.J. // *Antiviral Res.* 1998. V. 37. < 2. P. 121–130.

## Приложение

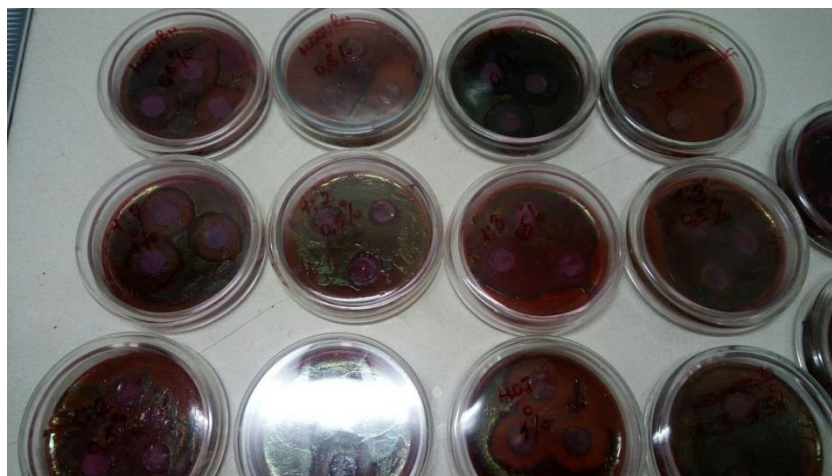


Рис. 24 Определение антибактериальной активности диско-диффузным методом.



Рис. 25 Зона задержки роста при действии экстрактом расторопши в наноструктурированной форме.

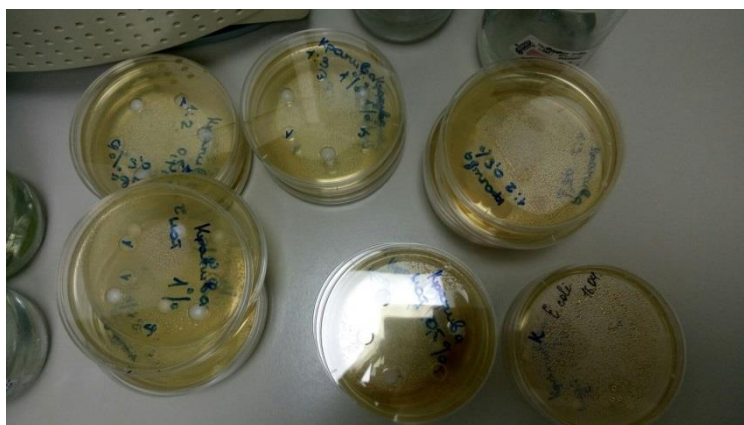


Рис. 26 Определение антибактериальной активности экстрактов крапивы методом лунок.



Рис. 27 Пересев *E.coli* методом штриха.