

М.К. БАКУЛИН, С.В. ДАРМОВА, Е.М. ГОРДЕЕВА, В.М. БАКУЛИН

Вятский Государственный университет, Киров

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ КОЛЛЕКТОРЫ ФИТОНЦИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ ПЕРФТОРУГЛЕРОДОВ

В работе рассматриваются теория и практика использования перфторуглеродов (ПФУ) в качестве молекулярных коллекторов летучей и нелетучей фракций фитонцидных комплексов разных растений, позволяющих проводить сбор и стабилизацию всего пула биологически активных веществ для полноценной оценки их антибиотической активности в отношении тест-культур микроорганизмов.

Ключевые слова: фитонциды, растения, перфторуглероды (ПФУ), микроорганизмы, антибиотическая активность.

M.K. BAKULIN, S.V. DARMOVA, E.M. GORDEEVA, V.M. BAKULIN

Vyatka State University, Kirov

MOLECULAR COLLECTORS OF PHYTONCIDES COMPLEXES ON THE BASE OF PERFLUOROCARBONS

The investigation deals with theory and practical usage of perfluorocarbons as molecular collectors for volatile and nonvolatile fraction of different plants' phytoncides complexes, which allow to collect and stabilize every biologically active substance for the full evaluation of their antibiotic activity with respect to microorganisms' test cultures.

KEYWORDS: phytoncides, plants, perfluorocarbons, microorganisms, antibiotic activity.

На длинном историческом пути развития медицины и ветеринарии растительное сырьё всегда занимало ведущие места среди средств лечения больных и защиты ран различной этиологии от нагноения [1]. Важным этапом на этом пути явилось создание отечественным ученым Борисом Петровичем Токиным учения об антимикробных биологически активных веществах растений – фитонцидах (от греч. *phyton* – растение и лат. *caedere* – убивать) [2]. Сам термин «фитонциды» был предложен Б.П. Токиным в 1928 году для обозначения синтезируемых растениями антимикробных веществ, обладающих разнообразным химическим составом, агрегатным состоянием, спектром и механизмами действия [2]. Позже было установлено, что фитонциды кроме способности убивать или подавлять рост и развитие микроорганизмов могут обладать инсектицидными и антигельминтными свойствами, оказывать обще-стимулирующее, противовоспалительное, регенерационное, противоаллергическое, интерфероногенное и другие воздействия на организм человека и животных [3].

В химическом плане фитонциды представляют собой сложный комплекс химических соединений [3-5]. Обычно различают две фракции: летучую и нелетучую. Летучие фракции фитонцидов представляют собой комплекс легкоиспаряющихся и газообразных соединений. Среди них встречаются антоцианы, низкомолекулярные предельные (метан, этан, пропан, бутан) и непредельные (этилен, пропилен, изобутилен, бутилен) углеводороды, летучие алифатические альдегиды, низкомолекулярные жирные кислоты и их эфиры, серосодержащие алифатические соединения, полиацетатные вещества, низкомолекулярные спирты (метанол, этанол и др.), терпеноиды, смолы, эфирные масла и другие соединения. В хвойных растениях одним из компонентов фитонцидного комплекса является монометиловый эфир пиносилвина. Нелетучие фракции фитонцидов – биологически активные вещества различной природы, находящиеся во внутритканевом соке растений.

К настоящему времени из высших растений выделено более 700 антибиотических веществ. Из них наиболее изучены: аллицин, выделяемый из чеснока; госсипол – из семян хлопчатника; хинин – из хинного дерева; берберин – из лютиковых и барбарисовых расте-

ний; рицин – из клещевины и омелы белой; фитоалексины, вырабатываемые растениями в ответ на внедрение паразитов (пизатин из гороха, фазеолин из фасоли) [4].

Исходя из возрастания в наши дни интереса к разностороннему действию на микро- и макроорганизмы биологически активных веществ растений, актуальной остаётся задача разработки универсального подхода стабилизации комплекса фитонцидов для определения антимикробной активности и дальнейшего использования на практике в медицине, ветеринарии и косметологии. Эта задача может быть решена за счет разработки условий адекватной пробоподготовки растительного сырья и, в первую очередь, использования веществ-коллекторов (от лат. *collector* – собирающий), способных аккумулировать при измельчении и сохранять в исходном состоянии все компоненты (летучие и нелетучие; твердые, жидкие и газообразные) фитонцидных комплексов. При этом вещества-коллекторы должны способствовать полноценному проявлению биологической активности фитонцидного комплекса и быть достаточно инертными в отношении биологических тест-объектов.

Целью работы являлось теоретическое и экспериментальное обоснование возможности использования полностью безопасных для прокариот и эукариот перфторуглеродов (ПФУ) в качестве веществ-коллекторов, способных аккумулировать и сохранять компоненты фитонцидных комплексов.

Основная задача исследования сводилась к оценке способности эмульгированных до частиц с размерами 30÷150 нм в составе коммерческого перфторана и целевых жидких ПФУ аккумулировать и сохранять фитонцидные комплексы для последующего анализа их антимикробной активности в отношении тест-культур различных микроорганизмов.

Теоретической предпосылкой выбора ПФУ в качестве веществ-коллекторов явилось наличие у них комплекса уникальных свойств, в том числе: атоксигенности и инертности для прокариот и эукариот; исключительной химической, физической и биологической устойчивости; способности стабилизировать биохимические процессы; легко растворять и сорбировать на себе газы и биологически активные вещества, находящиеся в разном агрегатном состоянии, которые при определенных условиях с легкостью передаются другому реципиенту [6-8]. Наличие таких свойств у ПФУ было доказано при многолетнем использовании их в составе кровезаменителей Охугент, Liqui Vent, Therox, Охуфлуор (США); Fluosol-DA (Япония); Emulsion II (Китай); перфторан (Россия) и объясняется особой стереохимией перфторуглеродных молекул при исключительной прочности ковалентных связей С—F. Длины связей фтора и водорода с углеродом равны 1,39 Å и 1,09 Å, но атом фтора в 19 раз тяжелее атома водорода [9, 10]. Это позволило остановить наш выбор на ПФУ при поиске веществ, способных выступать в роли молекулярных коллекторов (биосорбентов или биостабилизаторов).

Материалы и методы

Растительное сырье: хвоя сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.), ели сибирской (*Picea obovata*), лиственницы Сукачёва (*Larix Sukaczewii* Djl); листья березы плакучей (*Betula pendula* Roth), рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia*).

Цельные растения подроста отбирали с почвой для сохранения в жизнеспособном состоянии на пути доставки в лабораторию в мае-июне 2010 г. в Белохолуницком и Вятскополянском районах Кировской области.

Тест-культуры бактерий: кишечная палочка (*Escherichia coli* M 17), выделенная из сертифицированного препарата «Колибактерин», сенная палочка (*Bacillus subtilis* 3) – из сертифицированного препарата «Биоспорин», золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus* K78) и синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa* K9) – выделены из почвы сотрудниками ВятГУ; микромицетов: *Fusarium oxysporum* 1524, *Fusarium culmorum* K-8996, любезно предоставлены ГУ ЗНИИСХ Северо-Востока им. Н.В. Рудницкого.

В качестве коллекторов фитонцидных комплексов использовали: *перфторан* (ПФ) – кровезаменитель производства ОАО «Перфторан» РАН серии 711201, представляет собой субмикронную эмульсию частиц перфтордекалина (ПФД) и перфторметилциклогексилпиперидина (ПФМЦП) с размерами 30÷150 нм, ПФ содержит 10 об.% ПФД и ПФМЦП; *перфтордекалин* (ПФД – C₁₀F₁₈) и *карбогал* (КГ – C₈F₁₆) производства ОАО «Кирово-Чепецкий химический комбинат им. Б.П. Константинова», ТУ 95-1233-92 с изм. 1 и ТУ 95-1693-88, бесцветные прозрачные негорючие жидкости без запаха, не растворимы в воде и в органических растворителях, исключительно инертны в химических реакциях, химически стойки к сильным

щелочам и кислотам, не горючи, взрывобезопасны, термически устойчивы до 400-450°C, относятся к категории нетоксических веществ; в качестве контролей использовали коммерческие препараты стерильных растворов с разным компонентным составом: полиглюкин (ПГ), содержащий в 100 мл 10 г декстрана; гемодез (ГД), содержащий в 100 мл 6 г поливинилпирролидона; дистиллированную воду (ДВ); стерилизованное тиндализацией нерафинированное подсолнечное масло (ПМ) ГОСТ-Р-52465-2005.

Измельчение анализируемого сырья проводили с использованием бытовых мельниц. Нами была использована мельница модификации ЭКМУ-30, мощностью 130 Вт, производства Армавирского электротехнического завода. В камеру $V_p = 40 \text{ см}^3$ помещали 10 граммов свежесобранной хвои или листьев. В крышку камеры был вмонтирован измельчитель с ножами и имелось отверстие диаметром 3 мм, которое после загрузки камеры герметично закрывали клеящейся пленкой для предупреждения испарения материала и потери легколетучивающихся фитонцидных веществ. Измельчение проводили течение 3 мин. в закрытой камере, доводя частоту вращения ротора до 3000 об.мин⁻¹ при максимальной линейной скорости на режущей части концов ножей до 12 м·сек⁻¹. Варьирование скоростью вращения ротора и временем измельчения позволяло получать порошки препаратов с различной степенью размельчения, с разбросом от 10 до 3000 мкм.

Сразу же после измельчения материала до порошкообразного состояния в отверстие в крышке камеры путем прокола герметизирующей пленки шприцевой иглой вводили 20 см³ ПФУ (или растворов сравнения). Заклеивали получившееся после иглы отверстие герметизирующей пленкой. Перемешивали материал в течение 2 мин. при скорости вращения ротора-измельчителя (перемешивающего устройства) до 700 об.мин⁻¹, что обеспечивало образование равномерной устойчивой взвеси измельченного материала в ПФУ, сорбцию и растворение летучих фракций. С целью оценки стабильности сохранения свойств готовые препараты в герметично закрытых флаконах хранили при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

В основу определения антимикробной активности фитонцидного комплекса положен метод определения минимальных ингибирующих (подавляющих) концентраций (МИК, МПК) антибиотиков для тест-культур микроорганизмов на плотных агаровых средах (для бактерий – на мясопептонном агаре, микромицетов – на среде Сабуро) [2]. На поверхность плотной питательной среды наносили 0,1 см³ свежесобранной в течение 24 ч. для бактерий и 48 ч. для микромицетов бульонной культуры тест-микроорганизма, содержащей 1×10^6 КОЕ·см⁻³ клеток соответствующего микроба по оптическому стандарту мутности (СОС ГИСК им. Л.А. Тарасевича), тщательно растирали ее шпателем Дригальского для получения при подращивании в течение 1-2-х суток однородного сплошного газона выросшей культуры. Засеянную микробной культурой поверхность плотной питательной среды подсушивали в течение 30 мин., после чего наносили микропипеткой по периметру плотной питательной среды в чашке Петри в шесть секторов по 25 мкл исследуемой пробы (капельно). Капли размещали на 1,5 см от края чашки. Чашки не переворачивая, выдерживали в термостате на 28°C в течение 24 ч. при использовании в качестве тест-микроорганизмов бактерий, при использовании микромицетов – 72 ч. Результаты учитывали путем измерения зон (диаметров) ингибирования роста микробных культур вокруг нанесенных капель.

Результаты исследования

Результаты экспериментов, представленные в табл. 1 и 2, позволяют расположить семь исследованных веществ в порядке снижения способности аккумулировать и проявлять антибиотическое действие после приготовления *ex tempore* фитонцидных комплексов из хвои сосны и из листьев березы следующим образом: ПФД, КГ, ПФ, ГД, ПГ, ПМ, ДВ. При этом все семь веществ без фитонцидных комплексов не ингибировали рост тест-культур микроорганизмов (см. контроль табл. 1).

Лучшим коллектором фитонцидных комплексов показал себя перфтордекалин, который обеспечил не только максимальное проявление антимикробной активности получаемых препаратов из разного растительного сырья, но и позволил сохранить активность комплекса после тридцати суток хранения на уровне около 80-90% (в среднем) от активности исходных препаратов в отношении всех тест-культур бактерий и микромицетов. Карбогал ненамного уступал по оцениваемым показателям перфтордекалину, и его следует признать резервным коллектором фитонцидных комплексов.

Перфторан, содержащий 10 об.% субмикронной эмульсии частиц ПФД и ПФМЦП с размерами 30÷150 нм, по способности аккумулировать и сохранять фитонцидный комплекс уступал препаратам цельных перфторуглеродов.

Таблица 1

Фитонцидная активность проб хвои сосны *Pinus sylvestris* L.

Срок хранения при 4±2°C, сут.	КФК	Диаметр зон ингибирования тест-культуры штамма ... вокруг анализируемой пробы, мм ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=7)			
		<i>E. coli</i> M 17	<i>B. subtilis</i> 3	<i>S. aureus</i> K78	<i>P. aeruginosa</i> K9
0*	ПФ	14±2	12±2	18±2	14±3
	ПФД	25±2	24±3	25±3	19±3
	КГ	18±3	13±2	24±3	18±2
	ПГ	16±3	11±2	17±2	15±3
	ГД	17±2	12±3	19±2	16±3
	ДВ	11±3	9±2	12±3	12±2
	ПМ	12±3	16±2	18±3	14±2
7	ПФ	11±2	12±2	16±2	12±2
	ПФД	25±2	23±3	23±3	18±3
	КГ	15±3	11±2	22±3	16±3
	ПГ	10±3	10±2	10±2	9±2
	ГД	11±2	12±3	12±2	11±3
	ДВ	-	-	-	-
	ПМ	8±3	8±2	11±3	8±2
30	ПФ	8±2	6±2	15±2	10±2
	ПФД	19±2	19±3	21±3	15±3
	КГ	12±3	10±2	19±3	14±3
	ПГ	-	-	-	-
	ГД	5±2	5±2	7±2	-
	ДВ	-	-	-	-
	ПМ	-	-	-	-
Контроль**	ПФ	-	-	-	-
	ПФД	-	-	-	-
	КГ	-	-	-	-
	ПГ	-	-	-	-
	ГД	-	-	-	-
	ДВ	-	-	-	-
	ПМ	-	-	-	-

Примечания. 1. Здесь и в табл. 2, 3 приняты сокращения:

КФК – коллектор фитонцидных комплексов, ПФ – перфторан, ПФД – перфтордекалин, КГ – карбогал, ПГ – полиглюкин, ГД – гемодез, ДВ – дистиллированная вода, ПМ – подсолнечное масло;

2. * – анализ проводился сразу после приготовления препаратов (ex tempore);

3. ** – представлены контроли определения инертности стабилизаторов без растительного сырья в отношении микроорганизмов;

4. (-) – отсутствие угнетения роста.

Листья и хвоя использованных растений обладали разной активностью и спектром действия присущих им фитонцидных комплексов, что отмечалось по разнице размеров зон ингибирования роста тест-культур микроорганизмов.

Фитонцидная активность проб листьев березы *Betula pendula* Roth

Срок хранения при 4±2°C, сут.	КФК	Диаметр зон ингибирования тест-культуры штамма ... вокруг анализируемой пробы, мм ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=7)			
		<i>E. coli</i> M 17	<i>B. subtilis</i> 3	<i>S. aureus</i> K78	<i>P. aeruginosa</i> K9
0	ПФ	17±2	13±2	11±2	15±2
	ПФД	22±3	20±3	19±3	24±3
	КГ	22±3	16±2	18±2	22±3
	ПГ	17±2	12±2	16±3	17±2
	ГД	21±2	14±3	18±3	19±2
	ДВ	16±3	14±2	13±2	14±3
	ПМ	19±3	15±2	13±3	18±3
30	ПФ	12±2	10±2	9±2	9±2
	ПФД	19±2	19±3	16±2	21±3
	КГ	17±3	14±2	14±3	18±3
	ПГ	-	-	-	-
	ГД	9±2	7±2	-	7±3
	ДВ	-	-	-	-
	ПМ	-	-	-	-

Таблица 3

Фитонцидная активность проб растений для бактерий и микромицетов

Растительное сырье	Срок хранения при 4±2°C, сут.	КФК	Диаметр зон ингибирования тест-культуры штамма ... вокруг анализируемой пробы, мм ($\bar{X} \pm I_{95}$, n=5)		
			<i>S. aureus</i> K78	<i>F. oxysporum</i> 1524	<i>F. culmorum</i> K-8996
Ель <i>Picea obovata</i>	0	ПФД	26±3	28±3	27±4
		КГ	25±2	27±3	27±3
		ПФ	17±2	19±2	20±2
	30	ПФД	23±3	24±3	24±3
		КГ	22±2	21±3	20±3
		ПФ	7±2	11±2	10±2
Лиственница <i>Larix Sukaczewii</i> Djil	0	ПФД	29±3	26±4	25±3
		КГ	28±2	24±3	24±3
		ПФ	16±2	14±2	15±2
	30	ПФД	26±3	23±3	23±3
		КГ	24±4	20±2	20±2
		ПФ	11±2	9±2	9±2
Рябина <i>Sorbus aucuparia</i>	0	ПФД	18±2	17±4	18±3
		КГ	15±2	15±3	18±3
		ПФ	11±2	14±2	14±2
	30	ПФД	17±3	12±3	21±3
		КГ	17±3	12±3	20±2
		ПФ	6±2	7±2	7±2

Наиболее выраженной фитонцидной активностью обладали препараты хвои ели, лиственницы, сосны, несколько меньшей – листьев березы и наиболее слабой – листьев рябины.

Выводы.

Проведенные исследования показали возможность использования перфтордекалина и карбогала в качестве веществ-коллекторов, способных аккумулировать фитонцидные комплексы разных растений и длительное время сохранять их биологическую активность в отношении бактерий и микромицетов, что с учетом других, уже описанных ранее, свойств ука-

занных перфторуглеродов целесообразно использовать в медицине и ветеринарии при разработке лечебных растительных препаратов.

Список литературы

1. Шлегель Г.П. История микробиологии / Пер. с нем. М.: Едиториал УРСС, 2006. 304 с.
2. Токин Б.П. Целебные яды растений. Повесть о фитонцидах. Л.: Изд-во ЛГУ, 1980. 280 с.
3. Георгиевский В.П., Комисаренко Н.Ф. Биологически активные вещества лекарственных растений. Новосибирск: Наука, 1990. 116 с.
4. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. М.: МГУ, 2004. 528 с.
5. Ягодин В.И., Балабанов В.И. Основы химии и технологии переработки древесной зелени. Л.: ЛГУ, 1981. 224 с.
6. Максимов Б.Н., Барабанов В.Г., Серушкин И.Л. и др. Промышленные фторорганические продукты. СПб: Химия, 1996. 544 с.
7. Бакулин М.К., Кучеренко А.С., Бакулина Л.В., Шведов В.В. Влияние перфторорганических соединений на рост стрептомицетов и биосинтез ими антибиотика даунорубицина // Антибиотики и химиотерапия, 2003. Т. 48. № 12. С. 5-8.
8. Бакулин М.К., Плетнева А.Ю., Грудцына А.С. Биологическая фиксация азота и рост бактерий рода *Azotobacter* в жидких средах в присутствии перфторуглеродов // Прикладная биохимия и микробиология, 2007. Т. 43. № 4. С. 443-449.
9. Иваницкий Г.Р. Наноконтейнеры на основе перфторуглеродов с функцией переноса оксида азота // Биофизика, 2008. № 2. С. 367-377.
10. Иваницкий Г.Р. Биофизика на пороге нового тысячелетия: перфторуглеродные среды и газотранспортные кровезаменители // Биофизика, 2001. № 1. С. 5-33.

Контактная информация:

Бакулин В.В. vladbakulin@rambler.ru