

© Коллектив авторов, 2009

В. А. Куркин¹, В. М. Рыжов¹, О. В. Бирюкова², Н. Б. Мельникова², В. В. Селехов²

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ФЛАВАНОЛОВ ПЛОДОВ РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ С ЛЕНГМЮРОВСКИМИ МОНОСЛОЯМИ ЛЕЦИТИНА И БИСЛОЯМИ ЛИПОСОМ

¹ ГОУ ВПО "Самарский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию", Самара, Россия;

² ГОУ ВПО "Нижегородская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию", Нижний Новгород, Россия

В сравнительном аспекте изучено взаимодействие силибина и дигидрокверцетина (таксифолина) — флаванолов плодов расторопши пятнистой [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] — с ленгмюровскими монослоями лецитина и бислоями липосом. Исследование показало, что данные флаванолы имеют различный механизм действия: дигидрокверцетин обладает преимущественно мембраностабилизирующим действием, тогда как для силибина характерна иммобилизация в гидрофобную часть фосфолипидного бислоя с образованием более гидрофильных мицеллярных структур. Наличие силибина и таксифолина в экстракте расторопши жидком позволяет предположить возможность реализации сочетанного механизма действия в данном препарате, а также в других суммарных лекарственных средствах на основе плодов расторопши пятнистой. Результаты данных исследований позволяют прогнозировать перспективу создания суммарных и комбинированных препаратов на основе плодов расторопши пятнистой и таксифолина, а также других флавоноидов, обладающих выраженным мембраностабилизирующим действием (кверцетин, рутин, диосмин и др.).

Ключевые слова: расторопша пятнистая, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., флавоноиды, флаволигнаны, силибин, дигидрокверцетин, лецитин, липосомы, мембраностабилизирующая активность

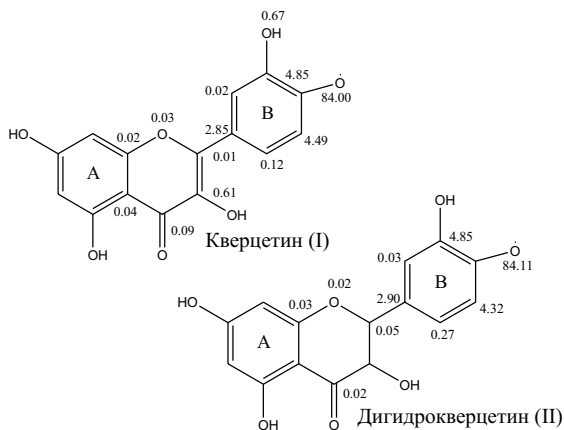
Биологически активные соединения (БАС) растительного происхождения, в частности, флаволигнаны (класс фенилпропаноидов) и биогенетически родственные фенилпропаноидам флавоноиды, являются ценными компонентами фитопрепаратов и пищевых добавок [1–3]. Основное их действие обусловлено сильной антиоксидантной активностью, способностью ингибировать свободно-радикальные процессы в клетках на 3 различных стадиях: инициации, путем связывания O_2^{\bullet} на стадии пероксидного окисления липидов (ПОЛ) реакцией как с пероксидным, так и с липидпероксидным радикалом, а также при формировании $OH\cdot$ -радикала, вероятно, путем хелатирования ионов железа.

Многочисленные экспериментальные исследования в водных системах позволили выявить следующие наиболее важные для антирадикальной активности структурные элементы молекул флавоноидов:

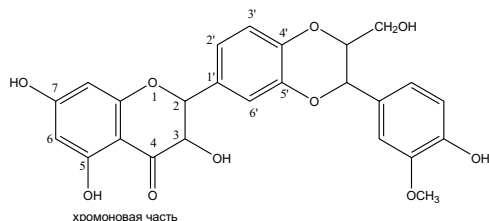
1. Две OH -группы в положениях $C-3^1$ и $C-4^1$.
2. Двойная связь между 2 и 3 атомами углерода, конъюгированная с карбонильной группой в положении $C-4$.
3. OH -группы в положениях $C-3$ и $C-5$ в сочетании с карбонильной группой в положении $C-4$.

Молекулы большинства флавоноидов имеют 2 или все 3 структурные группировки, определяющие антиоксидантное действие.

Структурный анализ и экспериментальные данные свидетельствуют о прямой взаимосвязи между антиоксидантной активностью флавонолов и количеством фенольных OH -групп в их молекулах. В молекулах флавонолов (I) и флаванололов (II), имеющих 5 гидроксильных групп, OH -группа в положении $C-4^1$ представляет собой наиболее предпочтительную мишень для радикальной атаки, при этом наличие OH -группы у соседнего атома углерода $C-3^1$ (катехоловая структура) или $C-3^1$ и $C-5^1$ (галловая структура) облегчает отрыв атома водорода. Между соседними гидроксильными группами кольца В образуются водородные связи, поэтому соединения, имеющие такие структуры, характеризуются низким окислительным потенциалом и относительно легко образуют радикалы. Кроме того, присутствие *ortho*-дигидроксильной структуры приводит к большой делокализации неспаренного электрона и повышает стабильность феноксильного радикала, что следует из распределения спиновой плотности неспаренного электрона по структурам радикалов кверцетина и дигидрокверцетина [4].



Силибин, будучи флавоноидом и одновременно флаволигнаном [1, 2], имеет более сложную химическую природу: 1) хромоновая часть молекулы проявляет слабые кислотные свойства и способна вступать в донорно-акцепторные взаимодействия с основаниями; 2) фенольные гидроксилы обуславливают взаимодействие этого соединения с сильными щелочами и растворение в воде в виде натриевых (калиевых) солей.

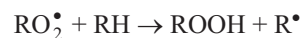


За счет полифенольных гидроксильных групп, а также за счет возможности комплексообразования с ионами переходных и других металлов в положении 3, 4 или 5, силибин проявляет высокую антиоксидантную способность.

Антиоксидантные свойства силибина определяют его высокие гепатопротекторный, противоопухолевый и другие эффекты [1, 2]. Сравнительные данные в экспериментальной системе “CCl₄-индуцированное ПОЛ в микросомах из печени крыс” показали, что относительная ингибирующая или защитная эффективность БАС уменьшается в ряду лютеолин > апигенин > дадистетин > морин > галангин > эриодиктиол > (+) катехин > гарденин Д > силибин [5]. Кроме того, известно, что флаволигнаны этой группы — силибин и силимарин (сумма флаволигнанов) подавляли рост и синтез ДНК в разных клеточных линиях опухолей человека [6]. Силибин и дигидрокверцетин снижали в клетках синтез холестерина посредством ингибирования скорости-лимитирующего фермента 3-гидрокси-3-метилглутарил-К_oA-редуктазы [7]. Медико-биологическое действие флавоноидов широко представлено в обзоре [8].

В гетерофазных системах, таких как клетки или липопротеины, антиоксидантная эффективность флавоноидов во многом определяется их липофильностью и гидрофильностью. Флавоноиды, аналогично α-токоферолу и холестерину, стабилизируют мембраны и выступают в качестве структурных антиоксидантов. Про-

никая в гидрофобную область мембран, молекулы флавоноидов значительно снижают подвижность липидов, что в свою очередь снижает эффективность взаимодействия пероксидных радикалов с новыми липидными молекулами.



Гепатопротекторный эффект силимарина и его главного компонента силибина обусловлен не только антиоксидантной активностью данных флавоноидов, но и их мембраностабилизирующим и метаболическим (стимуляция биосинтеза белка, ускорение регенерации поврежденных гепатоцитов) действием [9].

Таким образом, можно отметить, что фармакологические эффекты флавоноидов в значительной степени определяются их гидрофильно-липофильным соотношением и соответственно их проницаемостью через липофильные бислои мембран клеток.

Целью настоящей работы было исследование взаимодействия силибина (III) и дигидрокверцетина (II) — основных действующих компонентов фитопрепаратов на основе экстракта расторопши пятнистой, с леггмюровскими монослоями лецитина и бислоями липосом как простейшими моделями липидной части биомембран. Информация о воздействии этих БАС на мембраны позволяет предсказать не только проницаемость и путь доставки лекарственных веществ из препаратов на основе расторопши пятнистой, в которых изучаемые соединения присутствуют, но и предложить новые эффективные лекарственные формы препарата.

Экспериментальная часть

ГСО Силибин получен на кафедре фармакогнозии с ботаникой с основами фитотерапии ГОУ ВПО Самарского государственного медицинского университета Росздрава. Дигидрокверцетин 98 % чистоты, полученный из измельченной древесины лиственницы (торговая марка “Биоскан”), был предоставлен ООО “Росбиопром” (Саров Нижегородской обл.). Яичный лецитин был получен согласно методике [10] и соответствовал 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолину. “Экстракт расторопши жидкий” на 80 % этиловом спирте (1:1) (ВФС-42-3381-99) был предоставлен ЗАО “Самарская фармацевтическая фабрика” совместно с Самарским государственным медицинским университетом. Содержание флаволигнанов в данном экстракте в пересчете на ГСО силибин составляет 2,50 %. Фитопрепарат “Марисил” (ТУ 9146-002-14551985-04) произведен в условиях ЗАО “Самаралектравы” (Самарская обл.) и представляет собой спиртовое извлечение из плодов расторопши (производство ЗАО “Самаралектравы”), а именно настойку на 80 % этиловом спирте (1:5), не содержащую вспомогательных веществ. Содержание флаволигнанов в фитопрепарате “Марисил” в пересчете на ГСО силибин составляет 0,53%.

Электронные спектры поглощения растворов силибина и дигидрокверцетина, их смесей, а также раство-

ров фитопрепаратов из расторопши пятнистой в области 200 – 500 нм были получены на приборе “Bioline Specord S 100” фирмы Analytik Jena AG, толщина кварцевой кюветы 10 мм. В качестве растворителей использованы спирт, ацетонитрил и универсальная буферная смесь. Идентификацию флавоноидов проводили методом ВЭЖХ на хроматографе “Shimadzu LC-10”. ГСО флавоноидов проанализированы на колонке C₁₈, подвижная фаза — смесь ацетонитрила и воды в градиентном режиме при скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин. Спектры поглощения силибина и дигидрокверцетина имеют полосу в области 230 нм и полосу с максимумом 287 нм (силибин) и 290 нм (дигидрокверцетин). Сравнительный анализ ВЭЖ-хроматограмм был выполнен детектированием при длинах волн 287 и 290 нм для растворов индивидуальных веществ силибина и дигидрокверцетина, соответственно и при 287 нм для спиртовых экстрактов. Элюирование проводили в следующем режиме:

τ, мин	Объемное соотношение ацетонитрил – вода
0	95:5
10	5:95
15	5:95

1. Получение мономолекулярной пленки и изотерм сжатия

Для изучения монослоев использовалась оригинальная автоматизированная установка, созданная на кафедре “ЯР и ЭУ” физико-технического факультета Нижегородского государственного технического университета (рис. 1). Весы Ленгмюра, снабженные ИК-датчиком, позволяют обеспечить точность измерения поверхностного давления $\pi = 0,05$ мН/м, погрешность определения молекулярной площади составляла не более 2 – 5%. Размеры тефлоновой ванны 200 × 137 × 2 мм, условная скорость сжатия (на молекулу) при указанных размерах ванны Ленгмюра равна $\approx 1,2$ Å²/мин · молекула. Для получения монослоев использовали лецитин (1-пальмитоил-2-олеил-sn-фосфатидилхолин) в качестве простейшей модели липидной части мембраны, и его смеси с силибином и дигидрокверцетином. Для получения стабильных монослоев на поверхность субфазы по капельно наносились хлороформные или смешанные хлороформно-спиртовые растворы лецитина и его смесей с силибином и дигидрокверцетином. Время растекания и условия сжатия выбирались таким образом, чтобы изотермы сжатия не имели гистерезиса. В качестве субфазы использовали бидистиллированную воду.

Подготовка к эксперименту включала очистку тефлоновой ванны, неподвижного и подвижного барьеров хромовой смесью и бидистиллированной водой. Затем тефлоновую ванну заполняли субфазой и закрепляли барьеры. На поверхность субфазы наносили раствор исследуемого вещества. Время достижения полного равновесия после испарения растворителя составляло 30 мин, через 30 мин после полного растекания пленки по поверхности субфазы проводили измерения.

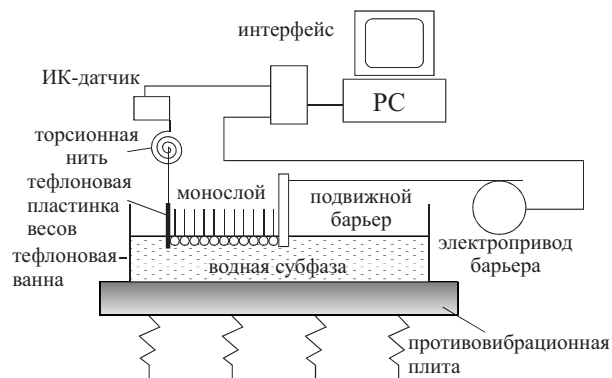


Рис. 1. Схема прибора для формирования пленок Ленгмюра и определения параметров сжимаемости

2. Получение липосом

Растворяли 1 мг силибина или дигидрокверцетина, либо их смеси в 2 мл этилового спирта при нагревании на водяной бане. 36 мг мембранообразующего компонента (лецитина) растворяли в 8 мл хлороформа. Из полученной смеси удаляли органический растворитель и высушивали в круглодонной колбе на водоструйном насосе до образования пленки. К полученной пленке в токе азота добавляли в качестве дисперсионной среды 50 мл бидистиллированной воды, содержимое перемешивали до полного смыва пленки. Полученную суспензию подвергали обработке на ультразвуковом диспергаторе УЗДН-2Т при 44 кГц в течение 1 – 2 мин. Для получения липосом с фитопрепаратами использовали 1 мг сухого экстракта, полученного отгонкой растворителя из спиртовых экстрактов. Невключившийся материал отделяли гель-фильтрацией на колонках с сефадексом G-25 или G-50 (общий объем колонки = 44,0 мл). Липосомы, получаемые после гель-фильтрации, пропускали через колонку с сефарозой 4 В-CL (объем колонки равен 45,2 мл) при 4 °С.

Включение флавоноидов в липосомы контролировали до и после фильтрации электронной спектроскопией по коэффициенту пропускания (Т, %) водной фазы суспензии липосом в видимой области спектра, а также методом ВЭЖХ при детектировании в области 287 нм.

Размеры везикул оценивали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на сканирующем зондовом микроскопе “Solver Bio NT-MDT” (Зеленоград) в неконтактном режиме. Суспензию липосом наносили на стеклянную подложку (толщина 1мм), дисперсионную среду удаляли вакуумной сушкой.

Результаты и их обсуждение

УФ-спектры спиртовых препаратов “Экстракт расторопши жидкий” и “Марисил” характеризуются сильным поглощением в области 190 – 210 нм (поглощение полифенольных фрагментов, обычно фенольного кольца А в хромоновой части флавоноидов), основной полосой с $\lambda_{\max} = 288,89$ нм, размытым плечом при $\lambda = 325,03$ нм (рис. 2, а). Основной полосе поглоще-

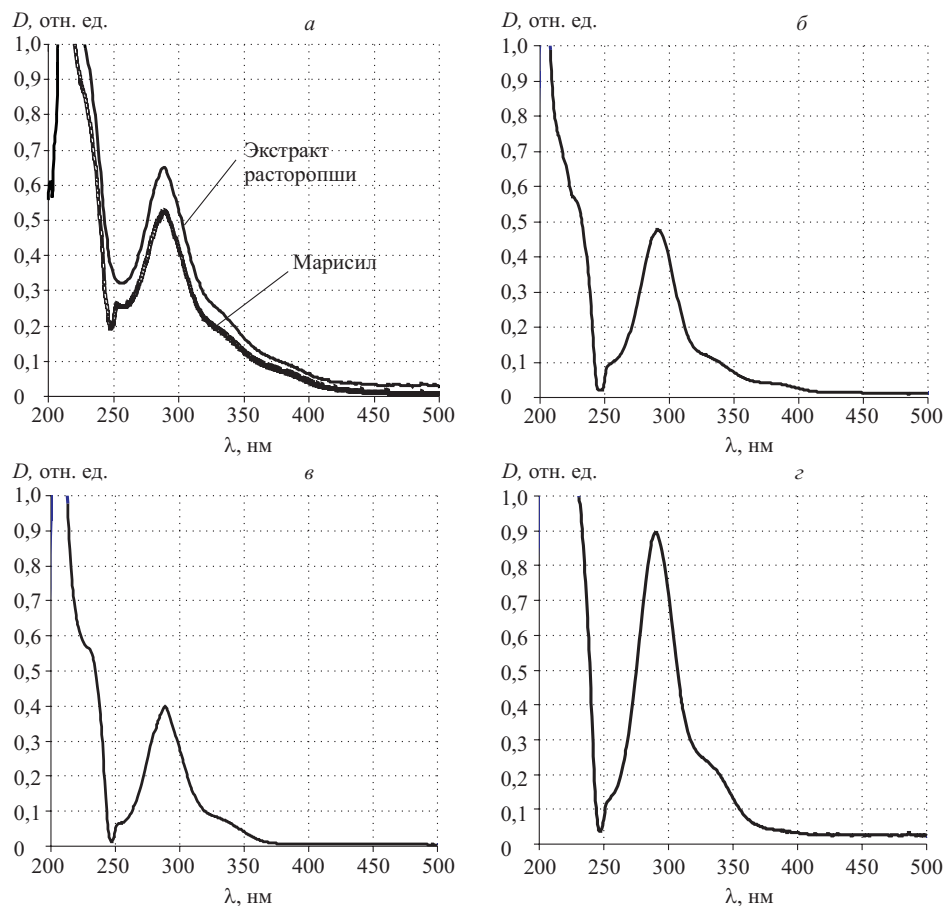


Рис. 2. Электронные спектры поглощения спиртовых растворов “Марисил” и “Экстракт расторопши жидкий” (а), $5 \cdot 10^{-5}$ М силибина (б), $5 \cdot 10^{-5}$ М дигидрокверцетина (в), смеси, содержащей $5 \cdot 10^{-5}$ М силибина и $5 \cdot 10^{-5}$ М дигидрокверцетина (г)

ния соответствует поглощение хромонового фрагмента дигидрокверцетина $\lambda_{\text{max}} = 290,12$ нм и силибина $\lambda_{\text{max}} = 288,49$ нм (рис. 2, б и в соответственно). Спиртовой раствор смеси дигидрокверцетина и силибина (образцы ГСО) имеют аддитивный УФ-спектр (рис. 2, г).

Использование ВЭЖХ при длине волны 287 нм на колонке C_{18} с подвижной фазой смесь ацетонитрила и воды при 40 °С позволило разделить эти БАС и дать сравнительную количественную характеристику “Экстракта расторопши жидкого” и фитопрепарата “Марисил” (рис. 3, а – г).

Расчитанное массовое содержание (%) силибина и дигидрокверцетина приведено в табл. 1.

ВЭЖХ анализ позволил установить, что при одинаковой концентрации основного действующего компонента силибина массовое содержание (%) дигидрокверцетина в препарате “Экстракт расторопши жидкий” почти в 1,7–1,8 раз меньше, чем в фитопрепарате “Марисил” (табл. 1).

Учитывая то обстоятельство, что дигидрокверцетин является не только антиоксидантом широкого спектра действия, но и проявляет Р-витаминную активность [3], изменение массового соотношения дигидрокверцетин – силибин при постоянной концентрации силибина, вероятно, может изменять механизм гепатопротекторного действия, в том числе и путь доставки дей-

ствующего компонента к биомишени, его проницаемость через липидные фрагменты биомембран и/или стабилизацию последних.

Изучение действия силибина и дигидрокверцетина на липидный фрагмент биомембраны проводили с использованием 2 модельных систем. В соответствии с первой модельной системой в качестве мембраны выступает ленгмюровский монослой, сформированный амфифильными соединениями на поверхности водного раствора (субфаза) [11]. Ленгмюровский монослой может состоять только из липидов (однородная поверхностная пленка), либо представлять собой смесь липидов и других БАС (смесевая пленка). В качестве субфазы может быть любая полярная жидкость, в том числе биологические среды, плазма крови, водные растворы лекарственных веществ и неорганических солей, изотонические растворы, вода и др., на поверхности которой можно получить устойчивую мономолекулярную пленку.

Второй методологический подход к изучению взаимодействия лекарственных веществ с биомембраной основывается на использовании фосфолипидных везикул или липосом [12]. К везикулам относят полые наночастицы, имеющие форму сферы с замкнутой оболочкой из липидной мембраны (одно- или многослойной), внутри которой находится водный раствор.

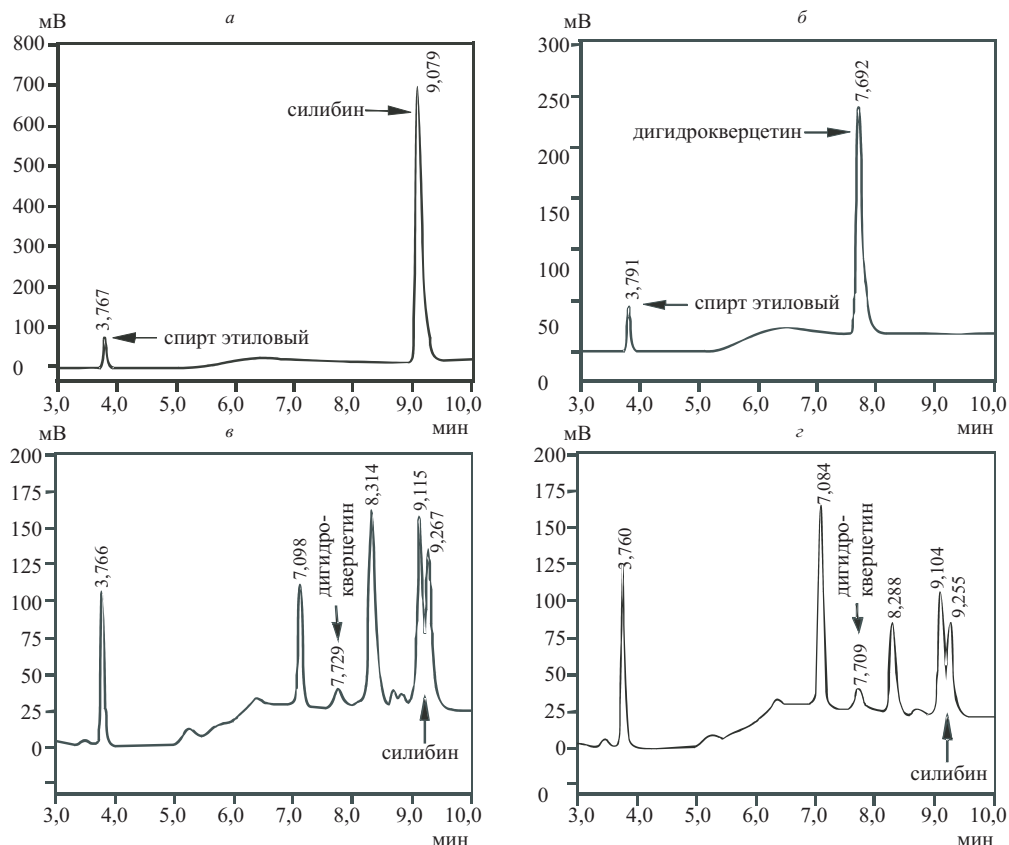


Рис. 3. ВЭЖ-хроматограммы спиртовых растворов: а) ГСО силибина; б) ГСО дигидрокверцетина; в) фитопрепарата “Экстракт расторопши жидкий”; з) фитопрепарата “Марисил”

В работе был использован 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин (лецитин). Из приведенной формулы лецитина видно (рис. 4), что это соединение содержит как ионогенные, так и неполярные группы, т. е. является амфифильным. Исходя из этого в фосфолипидную мембрану были включены и изучаемые БАС, имеющие амфифильный характер.

Для формирования нерастворимого монослоя известное количество липида или его смеси с БАС, растворенного в летучем растворителе (хлороформ или спиртово-хлороформная смесь), наносили на водную поверхность. После полного удаления растворителя при сжатии монослоя измеряли площадь поверхности S и поверхностное давление $\pi = \gamma_0 - \gamma$, где γ и γ_0 — поверхностное натяжение водного раствора с нанесенным монослоем и при его отсутствии.

На рис. 5 – 7 приведены изотермы поверхностного натяжения $\pi = f(S_0)$ для монослоя яичного лецитина и его смесей с БАС. Величина S_0 характеризует площадь, которую занимает одна молекула лецитина в

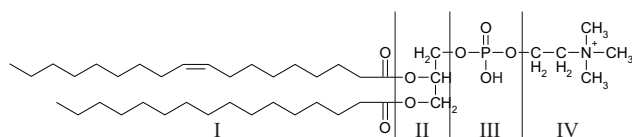


Рис. 4. Структура лецитина: I — жирнокислотные остатки, II — остаток глицерина, III — фосфатная группа, IV — холиновая часть

плотно упакованном монослое, моделирующем биомембрану.

Изотерма сжатия $\pi = f(S_0)$ для монослоя лецитина имеет типичный вид, характерный для соединений этого типа (рис. 5).

Экстраполяция на значение $\pi = 0$ позволяет оценить молекулярную площадь лецитина $S_0 = 0,55 \text{ nm}^2$. Теоретический расчет площади, занимаемой 2 плотно упакованными гидрофобными цепями лецитина, дает ве-

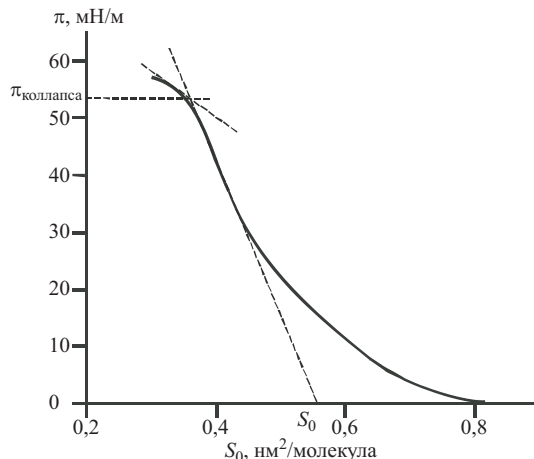


Рис. 5. Изотерма сжатия $\pi = f(S_0)$ монослоя лецитина на поверхности бидистиллированной воды (субфаза). $t = 26 \text{ }^\circ\text{C}$, $C = 3,9 \cdot 10^{-8}$ моль/поверхность субфазы, $V = 30$ мкл

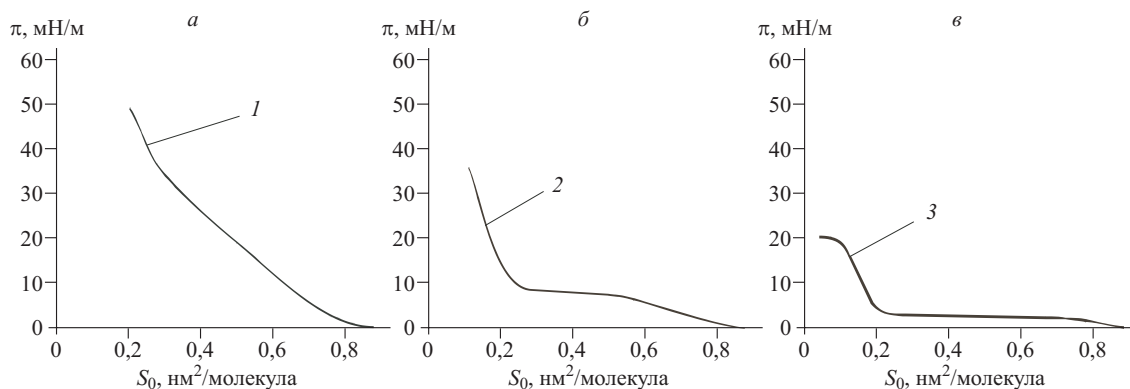


Рис. 6. Изотермы сжатия $\pi = f(S_0)$ системы лецитин – силибин (15:1). Концентрация лецитина $5,25 \cdot 10^{-8}$ моль/поверхность субфазы, силибина — $3,46 \cdot 10^{-9}$ моль/поверхность субфазы, $t = 26^\circ\text{C}$

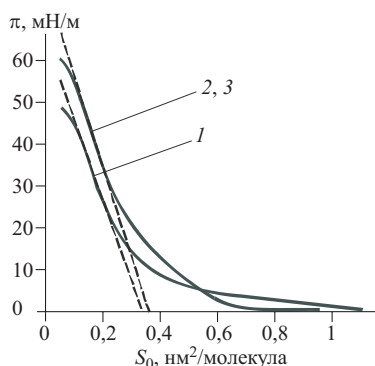


Рис. 7. Изотермы сжатия смешанной пленки лецитин – дигидрокверцетин. Молярные соотношения лецитин – дигидрокверцетин: 1) 1:1 концентрация лецитина $4,72 \cdot 10^{-8}$ моль/поверхность субфазы, дигидрокверцетина — $4,7 \cdot 10^{-8}$ моль/поверхность субфазы, $t = 25^\circ\text{C}$; 2) 10:1 концентрация лецитина $4,1 \cdot 10^{-8}$ моль/поверхность субфазы, дигидрокверцетина — $4,3 \cdot 10^{-9}$ моль/поверхность субфазы, $t = 23^\circ\text{C}$; 3) 15:1 концентрация лецитина $4,1 \cdot 10^{-8}$ моль/поверхность субфазы, дигидрокверцетина — $6,45 \cdot 10^{-9}$ моль/поверхность субфазы, $t = 23^\circ\text{C}$

личину $S_0 = 0,41 \text{ nm}^2$. Однако в реальных условиях молекула лецитина в монослое содержит адсорбированную воду в своей полярной части и $S_0 = 0,52 - 0,56 \text{ nm}^2$.

Поверхностное давление разрушения $\pi_{\text{коллапса}}$ для лецитиновых монослоев зависит от природы липида и лежит в интервале $\pi_{\text{коллапса}} = 50 - 60 \text{ мН/м}$. Изотерма сжатия монослоя лецитина, приведенная на рис. 5, отражает формирование истинного монослоя, поскольку отсутствует гистерезис (несовпадение кривых сжатия и растяжения).

Принципиально иной характер имеют изотермы сжатия смесей лецитин – силибин (рис. 6, а – в). На кривых $\pi = f(S_0)$ можно отметить 2 области, различающиеся по параметру сжимаемости $\beta = d\pi/dS$. Для свежеприготовленной смеси экстраполяционные величины S_0 ($\pi = 0$) в I и во II областях равны $0,83 - 0,87 \text{ nm}^2$ и $0,48 - 0,52 \text{ nm}^2$ соответственно (рис. 6, а, кривая 1), поверхностное давление коллапса смешанной пленки уменьшается до 50 мН/м . Изменение эффективной молекулярной площади лецитина в присутствии сили-

бина в смешанной пленке свидетельствует о межмолекулярном взаимодействии компонентов монослоя. Вероятно, взаимодействие между силибином и лецитином происходит уже на стадии приготовления раствора для нанесения монослоя после смешения хлороформного раствора лецитина и спиртового раствора силибина. В подтверждение этого предположения свидетельствуют данные, приведенные на рис. 6, б, в (кривые 2, 3). С течением времени после выдержки смешанного хлороформно-спиртового раствора, содержащего лецитин и силибин, эффективная молекулярная площадь лецитина уменьшается практически вдвое с $0,54 \pm 0,04$ до $0,23 \pm 0,03 \text{ nm}^2$ после выдержки в течение 4,5 ч. Поверхностное давление коллапса при этом резко уменьшается с 55 ± 5 до $18 \pm 5 \text{ мН/м}$. Кроме того, межмолекулярное взаимодействие между компонентами в растворе оказывает влияние на состояние смешанной пленки: на изотермах сжатия $\pi = f(S_0)$ (2) и (3) отчетливо видны горизонтальные участки с $\pi = \text{const}$, характерные для поверхностного двумерного перехода из одного структурного состояния пленки в другое.

Вид изотерм и параметры сжатия ($S_0 = 0,23 \pm 0,03$) в смешанной пленке, полученной из “состаренного” раствора (выдержанного в течение 4,5 ч), справедливы для процесса поверхностного структурирования и мицеллирования. Следовательно, реакционная смесь силибина и лецитина даже при молярном соотношении 1:15 может приводить к образованию компактных бислоевых структур или “поверхностных” мицелл, имеющих полярную часть, более интенсивно взаимодействующую с водой. Величина π , отражающая межмолекулярное взаимодействие между компонентами пленки и молекулами воды, уменьшается от $50 - 60$ до 18 мН/м , что хорошо согласуется с высказанными предположениями (табл. 2).

Влияние дигидрокверцетина на состояние лецитинового монослоя менее значительно, чем силибина (рис. 7).

Состояние смешанных монослоев не зависит от времени выдержки раствора, из которого формируют монослой (от 1 мин до 5 ч). Изменение молярного отношения лецитин – дигидрокверцетин в смешанной

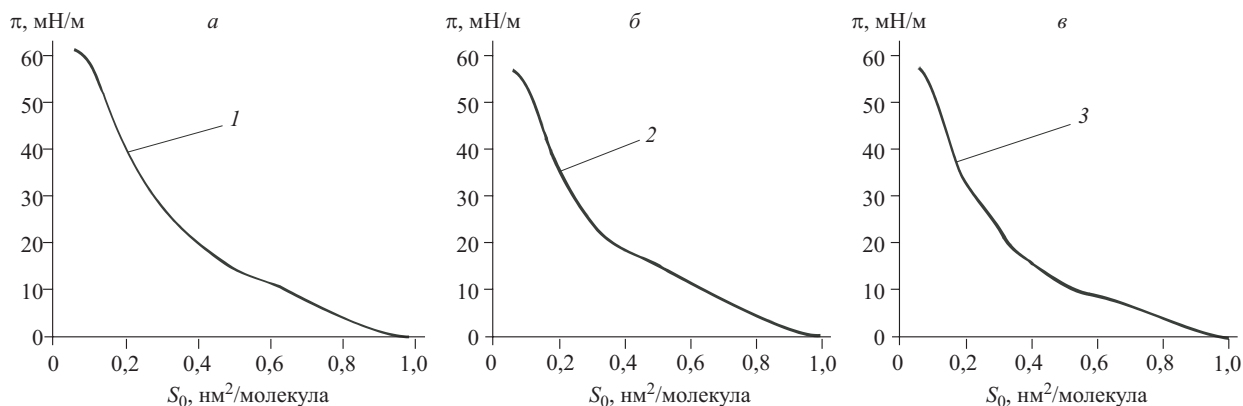


Рис. 8. Изотермы сжатия $\pi = f(S_0)$ смешанных монослоев лецитин – “Марисил”. Концентрация лецитина $4,6 \cdot 10^{-8}$ моль/поверхность субфазы, концентрация силибина $1,14 \cdot 10^{-9}$ моль/поверхность субфазы, $t = 25$ °С. Время выдержки: 1 — $\tau = 1$ мин, 2 — $\tau = 2,5$ ч, 3 — $\tau = 4,5$ ч

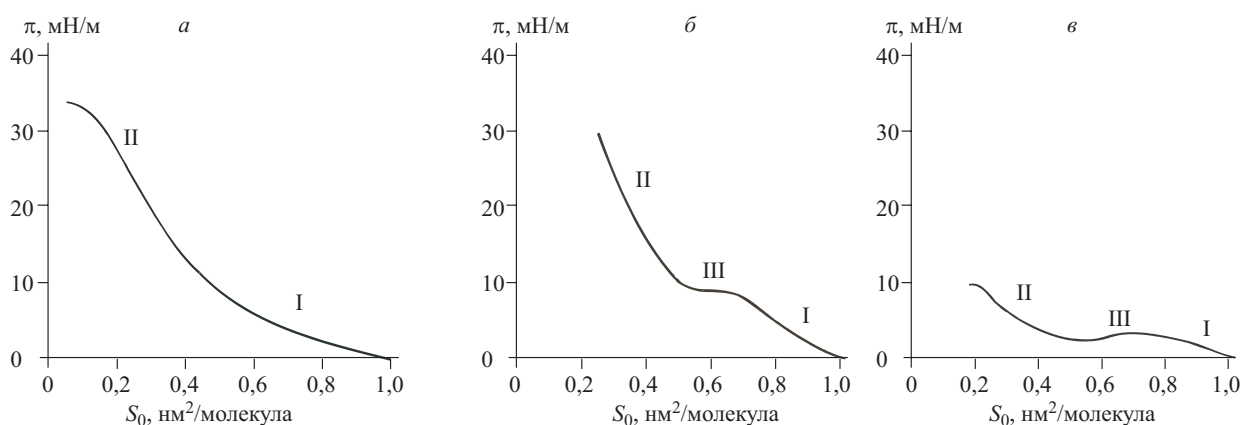


Рис. 9. Изотермы сжатия $\pi = f(S_0)$ системы лецитин – экстракт расторопши. Концентрация лецитина $4,6 \cdot 10^{-8}$ моль/поверхность субфазы, силибина — $1,5 \cdot 10^{-9}$ моль/поверхность субфазы: а) свежеприготовленная смесь; б) смесь выдержана 4,5 ч; в) смесь выдержана 7,5 ч

пленке от 15:1 до 1:1 несущественно влияет на вид изотерм, но приводит к значительному уменьшению эффективной молекулярной площади с $0,54 \pm 0,02$ до $0,35 \pm 0,02$ нм².

Снижение поверхностного давления в области коллапса от 55 до 45 мН/м отмечалось только при молярном соотношении лецитин – дигидрокверцетин, равном 1:1 (рис. 7). Наиболее вероятным объяснением этих фактов является феномен иммобилизации дигидрокверцетина в монослой, сопряженный с образованием поверхностной пленки иной структуры, чем однокомпонентная пленка лецитина. Поскольку в целом монослой остается липофильным ($\pi_{\text{коллапса}}$ имеют высокие значения), то можно предположить и адсорбцию дигидрокверцетина на поверхности монослоя (граница раздела монослой – воздух) за счет пенетрации и проницаемости дигидрокверцетина через гидрофобную часть лецитинового или смешанного монослоя. В целом следует отметить стабилизацию смешанных монослоев лецитина за счет дигидрокверцетина.

Для формирования липосомальной формы фитопрепаратов, содержащих изучаемые флавоноиды, весь-

ма важным является вопрос о природе их включения из спиртовых экстрактов в липидные слои, стабилизации или дестабилизации липидных слоев в присутствии флавоноидов.

Установлено, что устойчивые смешанные монослои лецитин — биологически активные вещества, полученные из спиртовых экстрактов, можно получить только при большом избытке лецитина в монослой: отношение лецитин – силибин (из экстракта “Марисил”) равно 40:1 (рис. 8), а отношение лецитин – силибин (из “Экстракта расторопши жидкий”) равно 30:1 (рис. 9). Отметим, что на поверхность субфазы наносилось одно и то же количество препаратов — $4,6 \cdot 10^{-4}$ г спиртовых экстрактов. Сопоставление данных рис. 8 и 9 показывает, что при одном и том же количестве спиртовых экстрактов, но разным количестве силибина в препаратах “Марисил” и “Экстракт расторопши жидкий” на поверхности субфазы, более устойчивые смешанные слои образуются из системы лецитин – экстракт “Марисил” (рис. 8), в котором абсолютное количество силибина меньше, а поверхностная концентрация дигидрокверцетина больше, чем в сме-

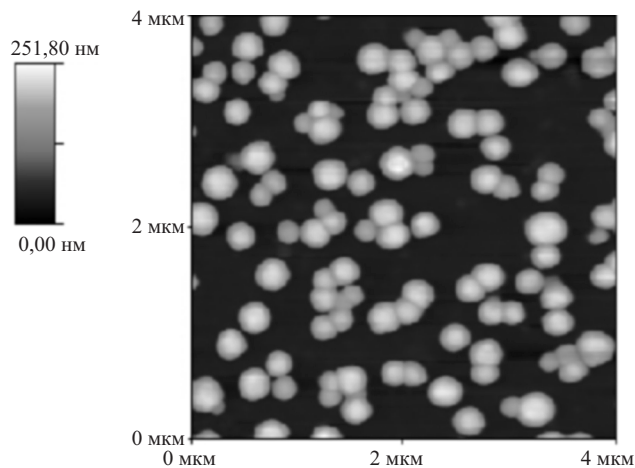


Рис. 10. АСМ-визуализация суспензии липосом, полученных из препарата “Экстракт расторопши жидкий”

шанных слоях, образованных системой лецитин – “Экстракт расторопши жидкий” (рис. 9). Полученные данные подтверждают наши наблюдения о том, что силибин в большей степени, чем дигидрокверцетин, обладает как солюбилизирующей способностью, так и большей способностью к образованию поверхностных ассоциатов с лецитином, сильно снижающих межфазное натяжение монослой – вода. В целом, на стабильность смешанных монослоев, полученных из систем лецитин – спиртовые экстракты, влияют как соотношение силибин – дигидрокверцетин, так и количество сухих биологически активных веществ в экстрактах (табл. 1).

Анализ изотерм сжатия многокомпонентных пленок, образованных экстрактом фитопрепарата “Марисил” и лецитином (рис. 8, табл. 3), показывает, что эффективная молекулярная площадь лецитина S_0 и величина $\pi_{\text{коллапса}}$ в смешанной многокомпонентной пленке близки к S_0 в двухкомпонентной пленке лецитин – дигидрокверцетин.

Уменьшение массовой доли дигидрокверцетина и массового отношения силибин – дигидрокверцетин в 1,7 – 1,8 раз в препарате “Экстракт расторопши жидкий” по сравнению с препаратом “Марисил” приводит к дестабилизации смешанной пленки лецитин – экстракт расторопши.

Изотермы поверхностного сжатия смешанных монослоев $\pi = f(S_0)$ имеют несколько двухмерных состо-

яний от состояния жидкой пленки (I), твердого (или жидко-твердого) состояния II, двумерных переходов из одного состояния в пленки в другие состояния III (рис. 9).

Учитывая тот факт, что влияние дигидрокверцетина на состояние смешанных пленок менее значительно, основные различия в изотермах сжатия пленок можно отнести к влиянию силибина. Дигидрокверцетин, как компонент смешанной пленки, способствует сохранению конденсированного состояния пленок при сжатии, характеризующегося значительной жесткостью, при этом область жидких пленок с меньшей сжимаемостью незначительна. Влияние силибина проявляется не только в резком уменьшении величины молекулярной площади, в снижении величины $\pi_{\text{коллапса}}$ до 0,1 – 2 мН/м в области жидких пленок, но и появлении в области жидких пленок протяженного плато.

Таким образом, можно высказать предположение, что увеличение относительной доли силибина в экстракте приводит к реорганизации поверхности мембраны, например, к поверхностному мицеллированию и разрыхлению лецитинового монослоя.

Изучение взаимодействия флавоноидов в плодах расторопши пятнистой с липидными слоями было проведено также на липосомах, в которых мембранообразующим компонентом являлся яичный лецитин, основу которого составляет 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин — соединение, из которого были сформированы лэнгмюровские монослои.

На рис. 10 представлено АСМ-фото суспензии липосом, включающих компоненты препарата “Экстракт расторопши жидкий”.

Аналогичная картина наблюдалась и для суспензии липосом, полученных из препарата “Марисил” и из водно-спиртовых растворов флавоноидов — дигидрокверцетина и силибина. Средний размер липосом 0,1 – 0,3 мкм.

Включение биологически активных веществ в липосомы было оценено с использованием электронной спектроскопии в видимой области спектра суспензии и исходных растворов, из которых формируются липосомы, а также ВЭЖХ анализа фильтрата (табл. 4).

Уменьшение коэффициента пропускания T , % (мутность есть функция размера) в электронных спектрах

Таблица 1

Содержание дигидрокверцетина и силибина в фитопрепаратах расторопши (ВЭЖХ)

Рис. № 3	Лекарственное средство	Концентрация действующих веществ, г/100 мл	Время выхода, т, мин/Е, мВ		Содержание в экстракте, %	
			силибин	дигидрокверцетин	силибин	дигидрокверцетин
в	“Экстракт расторопши жидкий”	0,014	9,115/180	7,729/15	10,71	4,29
г	“Марисил”	0,0092	9,104/105	7,709/20	10,87	7,61
а	Силибин РСО	0,0096	9,079/700	–	99,98	–
б	Дигидрокверцетин РСО	0,0092	–	7,692/240	–	99,22

Свойства смешанных монослоев лецитина и силибина в зависимости от времени выдержки неводных растворов перед формированием монослоев

Изотерма	Система	$\pi_{\text{коллапса}}, \text{ мН/м}$	$\pi_{\text{фазовый переход}}, \text{ мН/м}$	$S_0, \text{ нм}^2/\text{молекула}$	$S_1, \text{ нм}^2/\text{молекула}$
1	Свежеприготовленная смесь	50 ± 3	–	$0,50 \pm 0,02$	$0,85 \pm 0,02$
2	Смесь выдержана 1,5 ч	35 ± 2	6 – 7	$0,26 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,02$
3	Смесь выдержана 4,5 ч	18 ± 5	3	$0,23 \pm 0,03$	$0,87 \pm 0,03$

Свойства смешанных монослоев лецитина и “Марисила” в зависимости от времени выдержки неводных растворов перед формированием монослоев

Изотерма	Система	$\pi_{\text{коллапса}}, \text{ мН/м}$	$S_0, \text{ нм}^2/\text{молекула}$
1	Свежеприготовленная смесь	58	$0,41 \pm 0,02$
2	Смесь выдержана 2,5 ч	55	$0,40 \pm 0,02$
3	Смесь выдержана 4,5 ч	53	$0,35 \pm 0,03$

является одним из доказательств проницаемости флавоноидов через бислоюную мембрану.

Анализ электронных спектров пропускания и ВЭЖХ-анализ водной фазы суспензии липосом, полученных из смешанной пленки лецитин – флавоноид, а также пленки, полученной из изучаемых фитопрепаратов, после фильтрации суспензии, показал практически полное исчезновение флавоноидов из водной фазы (табл. 4). Стабильность липосом, полученных из смешанной пленки лецитин – силибин, мала (менее 1 сут.). Введение дигидрокверцетина в эквимолекулярном количестве с силибином в смешанную флавоноид-лецитиновую пленку повышает стабильность липосом (2 сут.). Учитывая чрезвычайно малую растворимость силибина в воде (табл. 4) и незначительную концентрацию невключенного силибина в растворе после фильтрации суспензии липосом, можно предположить включение силибина в гидрофобную часть фосфолипидного бислоя с образованием мицеллярных структур. Молекулы силибина, наиболее вероятно, располагаются внутри липидного слоя мембраны за счет гидрофобного связывания или адсорбции силибина на поверхности липосомы.

Меньшая стабильность липосом с силибином, вероятно, обусловлена самопроизвольным переходом мицеллярных структур лецитина с силибином из везикулярного состояния в объемные мицеллы. Это предположение подтверждается ВЭЖХ-анализом, в соответствии с которым концентрация освобожденного силибина после хранения суспензии липосом в течение 1 сут повышается с 0,05 до 1,5 мг/100 мл.

Растворимость в воде дигидрокверцетина намного больше, чем силибина, и можно предположить, что дигидрокверцетин будет находиться как в липофильном бислое мембран, так и в водной фазе (содержимом) липосом (табл. 4). Концентрация освобожденного дигидрокверцетина из липосом через 1 сут. меньше, чем концентрация освобожденного силибина (табл. 4), что подтверждает роль дигидрокверцетина в стабилизации мембран и согласуется с результатами исследований по влиянию дигидрокверцетина на лентгюровские монослои. Большей долей дигидрокверцетина в препарате “Марисил”, вероятно, объясняется и большая стабильность липосом, содержащих этот препарат, чем липосом, содержащих “Экстракт расторопши жидкий” (табл. 4).

Свойства дисперсии липосом

Содержимое липосом	$T, (\text{через } 1 \text{ ч}) \%$		$C_{\text{нач.}}$	Концентрация флавоноидов, мг/100мл		$C_{\text{в воде}}^*$
	333 нм	416 нм		$C_{\text{после фильтрации}}$		
				$\tau = 3 \text{ мин}$	$\tau = \text{сут}$	
Вода	45,6	63,9	–	–	–	–
Дигидрокверцетин	0,6	0,6	9,0	0,2	0,7	150,0
Силибин	0,5	0,4	7,2	0,05	1,5	9,6
“Марисил”	0,5	0,4	8,2	0,15	2,1	–
“Экстракт расторопши жидкий”	0,5	0,4	10,3	0,05	3,2	–

* Предельная концентрация флавоноидов при их растворении в воде под действием ультразвука.

Необходимо отметить, что изучаемые фитопрепараты содержат, кроме основных флавоноидов силибина и дигидрокверцетина, другие биологически активные вещества, в том числе и структурные изомеры силибина. Авторами работы [13] показано, что флавоноиды и изофлавоноиды взаимодействуют с липидными (холестерин, α -токоферол) бислойными мембранами по одному и тому же механизму. Следовательно, можно предположить, что действие силибина и его структурных изомеров на лецитиновую мембрану будет одним и тем же.

Таким образом, проведенные нами исследования показывают, что при практически одинаковой фармакологической (гепатопротекторной) активности фитопрепаратов “Марисил” и “Экстракт расторопши жидкий”, содержащим одну и ту же массовую долю основного действующего вещества — силибина, механизм их действия может значительно различаться. Изучение взаимодействия силибина и дигидрокверцетина с лентгмюровскими монослоями лецитина и бислоями липосом показало, что данные флавоноиды имеют различный механизм действия: дигидрокверцетин обладает преимущественно мембраностабилизирующим действием, тогда как для силибина характерна иммобилизация в гидрофобную часть фосфолипидного бислоя с образованием более гидрофильных мицеллярных структур. Следовательно, наличие силибина и дигидрокверцетина в препаратах “Марисил” и “Экстракт расторопши жидкий” позволяет предположить возможность реализации сочетанного механизма действия в данных препаратах, а также в других суммарных лекарственных средствах на основе плодов расторопши пятнистой. Результаты данных исследова-

ний позволяют прогнозировать перспективу создания суммарных и комбинированных препаратов на основе плодов расторопши пятнистой и дигидрокверцетина, а также других флавоноидов, обладающих выраженным мембраностабилизирующим действием (кверцетин, рутин, диосмин и др.).

ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Куркин, *Хим.-фарм. журн.*, **37**(4), 27 – 41 (2003).
2. В. А. Куркин, Г. Г. Запесочная, Е. В. Авдеева, В. Н. Ежков, *Фенилпропаноиды лекарственных растений*, ООО “Офор”, ГОУВПО “СамГМУ”, Самара (2005).
3. Н. А. Тюкавкина, *Биофлавоноиды. Химия, пища, лекарства, здоровье*, Актовая речь, Москва (2002).
4. S. A. Van AcKer, M. I. de Groot, D. I. van den Berg, et al., *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 1305 – 1312 (1996).
5. M. R. Cholbi, M. Paya, H. Y. Alcaras, *Experientia*, **47**, 195 – 199 (1991).
6. N. Bhatia, I. Zhao, D. M. Wolf, R. Agarial, *Cancer Sett*, **147**, 77 – 84 (1999).
7. G. Nassuato, R. M. Iemomolo, M. Strazzabasco, et al., *J. Hepatol.*, **12**, 209 – 295 (1991).
8. E. J. Middleton, C. Kandaswami, T. C. Theoharides, *Pharmacol. Rev.*, **52**, 673 – 751 (2000).
9. А. Адамсон, *Физическая химия поверхности*, Мир, Москва (1978).
10. Л. И. Барсуков, *Соросовский образоват. ж.*, № 10, 2 – 9 (1998).
11. Н. Д. Бунятыян, О. А. Герасимова, Т. С. Сахарова, Л. В. Яковлев, *Экспер. и клинич. фармакол.*, **62**(2), 64 – 67 (1999).
12. А. Е. Степанов, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец, *Физиологически активные липиды*, Наука, Москва (1991).
13. A. Arora, T. M. Byrem, M. G. Nair, and G. N. Strasburg, *J. Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 102 – 109 (2000).

Поступила 06.09.07

INTERACTION OF MILK-THISTLE-FRUIT FLAVANONOLS WITH LANGMUIR MONOLAYERS OF LECITHIN AND BILAYERS OF LIPOSOMES

V. A. Kurkin¹, V. M. Ryzhov¹, O. V. Biryukova², N. B. Mel'nikova², and V. V. Selekhnov²

¹ Samara State Medical University, Samara, Russia

² Nizhni Novgorod State Medical Academy, Nizhni Novgorod, Russia;

The results of a comparative study of the interaction of silybin and dihydroquercetin (taxifolin) – flavanols from milk thistle [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.] fruits – with the Langmuir monolayers of lecithin and the bilayers of liposomes are presented. It is established that the investigated flavanols have different mechanisms of action: taxifolin produces predominantly membrane-stabilizing action, whereas silybin is characterized by immobilization in the hydrophobic part of the phospholipid bilayer with the formation of more hydrophilic micellar structures. The presence of silybin and taxifolin in the liquid extract of milk thistle fruits makes suggests the possibility of realization of a dual mechanism of action in this preparation, and also in other combined medicines on the basis of these fruits. The results of this study show good prospects for creating combined preparations on the basis of the milk thistle fruits, taxifolin, and other flavonoids (quercetin, rutin, diosmin, etc.) possessing pronounced membrane-stabilizing action.

Key words: milk thistle, *Silybum marianum* (L.) Gaertn., flavonoids, flavolignans, silybin, dihydroquercetin, lecithin, liposomes, membrane stabilizing activity.