

БАКТЕРИЦИДНОСТЬ И РАДИКАЛОТРОПНОСТЬ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ СОСНЫ, ЭВКАЛИПТА И ЛИМОНА

В статье рассматриваются вопросы радикалотропных эфирных масел. Результаты исследований являются основой для их адекватного выбора и селективного использования против патогенов с одновременным снижением риска нарушения гомеостаза организма.

Ключевые слова: свободные радикалы, антиоксидант, прооксидант, хемилюминесценция, бактерицидность.

M.S. Sharapava, M.I. Lesovskaya

BACTERICIDAL AND RADICAL ACTION OF THE ESSENTIAL OILS OF PINE, EUCALYPTUS AND LEMON

The issues of the radicaloactive essential oils are considered in the article. The research results are the basis for their adequate choice and selective use against the pathogenes together with simultaneous decrease of an organism homeostasis disruption risk.

Key words: free radicals, antioxidant, prooxidant, chemiluminescence, bactericidal action.

Введение. В последнее время перечень загрязнителей воздушной среды расширяется за счёт штаммов микроорганизмов, устойчивых к синтетическим антисептикам и способствующих возникновению экологически обусловленных заболеваний [10], что снижает качество жизни человека. Не только сохраняется, но и возрастает актуальность выявления и изучения эффективных и экологически безопасных средств защиты организма человека от патогенных микроорганизмов. Важным способом обеспечения подобной защиты может стать использование эфирных масел (ЭМ) растительного происхождения. Благодаря давно выявленным противовоспалительным, противоотечным, обезболивающим, спазмолитическим свойствам, эти соединения используют в ароматерапии, профилактической медицине, лечебной косметике [8].

Однако научные основы их использования разработаны недостаточно. Считается, что эфирные масла не имеют негативного побочного влияния на организм и не вызывают привыкания. Тем не менее существуют ограничения по их использованию при ряде физиологических состояний (беременность) и патологий (аллергии, заболеваниях сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной и др. систем) [4]. Негативные эффекты в результате применения эфирных масел, как правило, связывают с «индивидуальной непереносимостью» и передозировкой ароматических препаратов. При этом авторы сходятся во мнении, что сочетание бактерицидной активности и способности образовывать нетоксичные комплексы с поллютантами позволяет использовать эфирные масла для оздоровления воздушной среды в производственных помещениях и в местах большого скопления людей [1, 6]. В то же время обоснованные методики расчета эффективных доз в ароматерапии отсутствуют, соответствующие рекомендации опираются лишь на органолептические показатели, а сведений о бактерицидности эфирных масел в отношении санитарно-показательных бактерий в литературе представлено недостаточно.

Известно, что бактерицидность воздушной среды во многом обусловлена содержанием отрицательных аэроионов, в первую очередь супероксиданион-радикала O_2^- [2], предшественника вторичных свободных радикалов с ещё более высокой химической активностью (например, OH^\cdot , H^\cdot и др.). Логично предположить, что эфирные масла, под влиянием которых усиливается продукция супероксиданион-радикала, будут наиболее эффективными бактерицидными средствами. Описанные в литературе попытки установить радикал-направленную активность эфирных масел дают противоречивые результаты вследствие использования различных экспериментальных условий.

Цель исследований. Выявление связи бактерицидных и радикалотропных свойств эфирных масел сосны, эвкалипта и лимона в условиях единой экспериментальной модели.

Задачи исследований: 1) определить характер и уровень радикалотропного влияния эфирных масел сосны, эвкалипта и лимона в модели стимулированных фагоцитов с использованием хемилюминесцентного анализа; 2) сравнить бактерицидность указанных эфирных масел эфирных масел в отношении санитарно-показательных микроорганизмов; 3) оценить взаимосвязь бактерицидности и радикалотропности эфирных масел, имеющих значение для оздоровления воздушной среды обитания.

Материалы и методы исследований. В работе использовали натуральные эфирные масла сосны, лимона и эвкалипта (ООО «Аспера», Россия). Радикалотропность эфирных масел изучали методом латекс-

стимулированной люминол- или люцигенинзависимой хемилюминесценции по Топо-Ока е.а. (1983) в модификации [3] с использованием программно-аппаратурного комплекса «Биохемилюминометр 3606-М» (СКТБ «Наука» СО РАН, г. Красноярск), работающего в режиме счета фотонов. В качестве источника свободных радикалов использовали фагоциты крови практически здоровых людей с заранее выявленным типом функционального ответа (нормо- или гипореактивный). Реакционная смесь включала 200 мкл разогретого до 37°C люминола или люцигенина, 100 мкл гепаринизированной крови [5], суспендированной в среде Хенкса (1:10), 50 мкл рабочего раствора латекса и 50 мкл препарата ЭМ (суспензия эфирных масел сосны, эвкалипта, лимона в среде Хенкса в концентрациях 1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,000001 %). Свежеприготовленную реакционную смесь вносили в кварцевые кюветы и помещали в барабан прибора. Длительность записи ХЛ-кинетики (не менее трёх повторностей) составляла 90 мин. При оценке кинетогрaмм использовали такие информативные параметры, как амплитуду ХЛ-реакции (I_{max} , имп/с), время достижения максимума (T_{max} , мин), суммарное количество квантов за время наблюдения, или светосумму (S , млн имп). По степени снижения или повышения продукции свободных радикалов в присутствии аналитов оценивали антиоксидантный или прооксидантный потенциал эфирных масел.

Бактерицидную активность определяли по степени подавления дегидрогеназной активности тест-культур в выбранной питательной среде [7]. Использовали стандартные штаммы санитарно-показательных бактерий *Staphylococcus aureus* (штамм MRSA) и *Escherichia coli*, а также грамположительных энтеросимбионтов *Bifidobacterium* на лабораторной базе ЦКП СФУ (г. Красноярск).

Результаты статистически обрабатывали с помощью программы *Statistica 6.0* и *Excel Microsoft Office 2000*. Достоверность отличий от контроля оценивали с помощью параметрического t -критерия Стьюдента или непараметрического T -критерия Уилкоксона для парных сравнений [11].

Результаты исследований и их обсуждение. На рис. 1 представлены результаты хемилюминесценции нормореактивных (Н) и гипореактивных (Гп) фагоцитов под влиянием суспензий ЭМ сосны при различных концентрациях с использованием различных активаторов свечения (люминол и люцигенин) при латекс-активированном (а) или базальном (б) функциональном ответе фагоцитов.

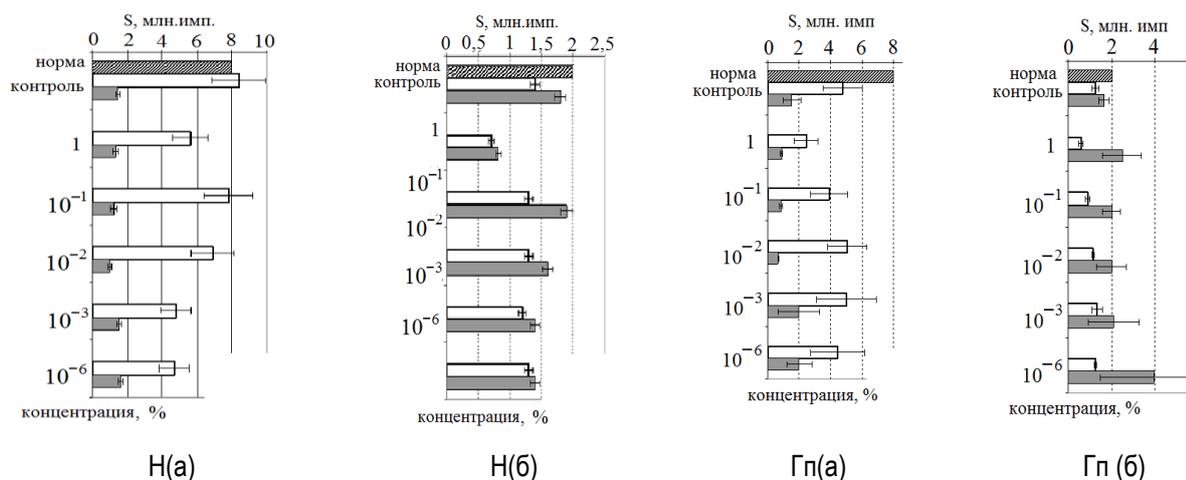


Рис. 1. Влияние различных концентраций эфирного масла сосны на светосумму активированной (а) и базальной (б) хемилюминесценции нормореактивных (Н) и гипореактивных (Гп) фагоцитов крови человека (светлые столбики – люминол, темные – люцигенин)

Из рис. 1 видно, что эфирное масло сосны оказывает устойчивое антиоксидантное воздействие в рассмотренном диапазоне концентраций, причём эффект наиболее выражен при активированном типе ХЛ-ответа с использованием люминола (ХЛ снижалась на 20–50 %). Данный химический активатор свечения легко взаимодействует с гидроксил-радикалами, гипохлоритом и некоторыми другими окислителями. В свою очередь, люцигенин более избирателен к супероксиданион-радикалу, порождающему вышеперечисленные АФК. Следовательно, можно предположить, что механизм АО-действия эфирного масла сосны обусловлен преимущественным взаимодействием с наиболее агрессивными вторичными радикальными формами, что согласуется с известными данными о высокой антисептической эффективности ЭМ сосны [9].

На фоне хемилюминесценции фагоцитов со сниженным функциональным ответом влияние данного эфирного масла имело регуляторный характер. В данном случае антиоксидантный эффект был выражен слабее, а главное, наблюдалось усиление свечения в варианте с люцигенином. Это косвенно указывает на

возможность активирующего воздействия препарата на ферменты, катализирующие образование радикалов супероксиданиона, что способно нормализовать функцию «ленивых фагоцитов» на предсимптомной стадии метаболического дисбаланса и препятствовать переходу стресса в дистресс.

Для ответа на вопрос, не истощается ли функциональный потенциал фагоцитов под влиянием эфирного масла, после записи кинетограмм базального ХЛ-ответа реакционную смесь, содержащую фагоциты, инкубировали в течение 1,5 ч с добавлением опсонизированного латекса (рис. 2). Судя по полученным результатам, после воздействия суспензии масла клетки сохраняли свою жизнеспособность и отвечали генерацией активных форм кислорода (АФК) на воздействие антигена независимо от вида ХЛ-зонда.

Эфирное масло эвкалипта в тех же экспериментальных условиях оказывало не антиоксидантное, а напротив, прооксидантное влияние на фагоциты крови человека (рис. 3).

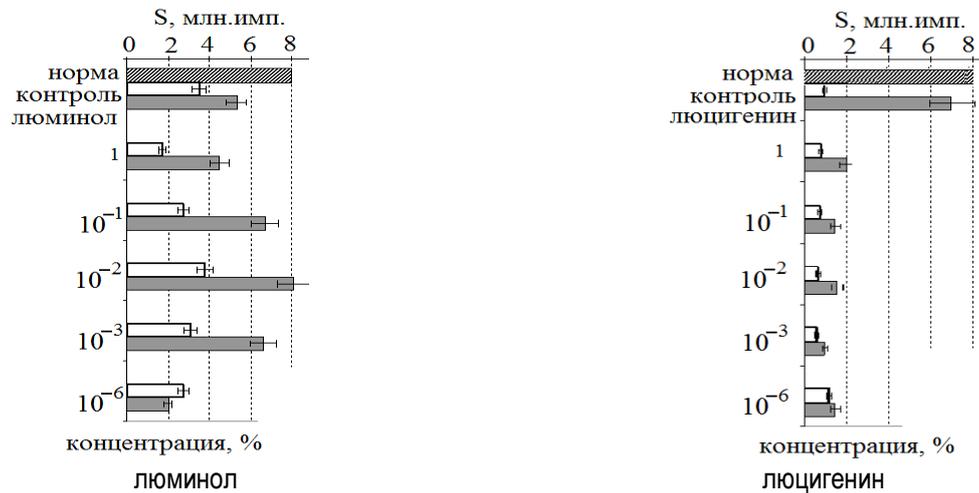


Рис. 2. Тушение активированной ХЛ нормореактивных фагоцитов крови человека под влиянием различных концентраций ЭМ сосны при использовании различных ХЛ-зондов

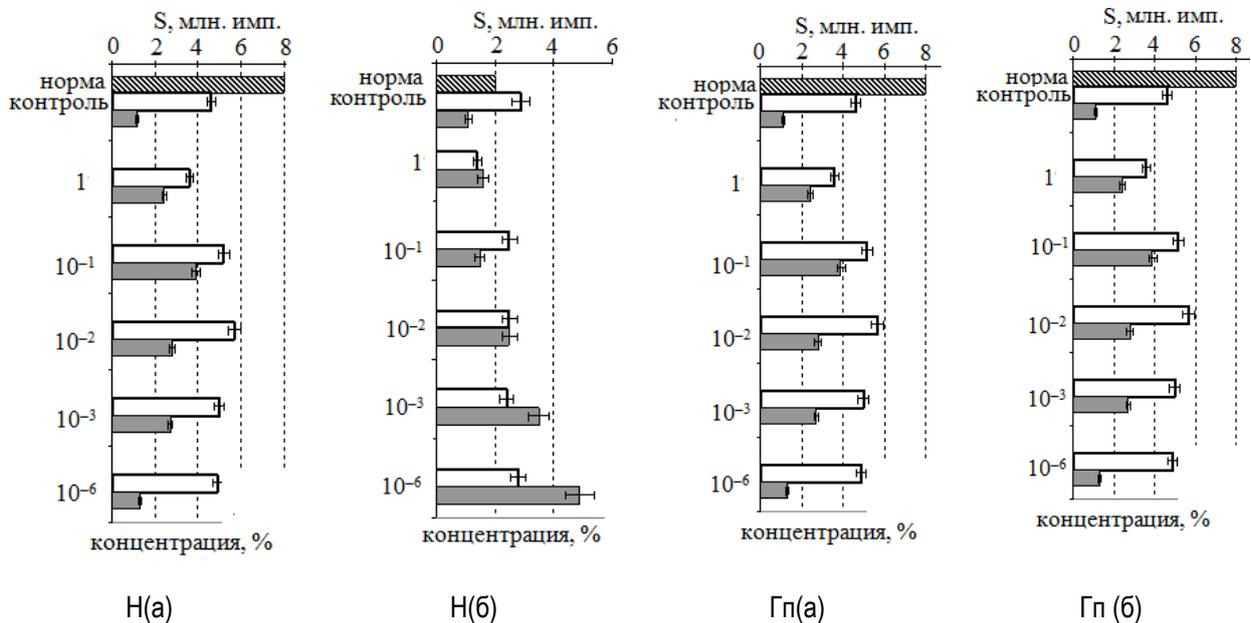


Рис. 3. Влияние различных концентраций эфирного масла эвкалипта на светосумму активированной (а) и базальной (б) гемилюминесценции нормореактивных (Н) и гипореактивных (Гп) фагоцитов крови человека (светлые столбики – люминол, темные – люцигенин)

При этом эффект был наиболее выражен при использовании люцигенина в качестве ХЛ-зонда. Это означает, что эффект ЭМ эвкалипта преимущественно связан с первичными супероксидными радикалами,

причем влияние имеет стимулирующий характер. Этот эффект также согласуется с феноменологией бактерицидного влияния препаратов эвкалипта, но в добавление к этому даёт возможность понять механизм оказываемого действия. Супероксиданион-радикалы способны разрушать мембраны бактериальных клеток, поэтому тот же эффект будут проявлять соединения, стимулирующие выработку активных форм кислорода в виде аэроионов.

Под влиянием эфирного масла лимона, как и эвкалипта, была обнаружена избирательная стимуляция продукции первичных супероксиданион-радикалов, легко возникающих в воздушной среде. При этом была выявлена обратная зависимость эффекта от исходного уровня радикалов (гипореактивные фагоциты, рис. 4,б).

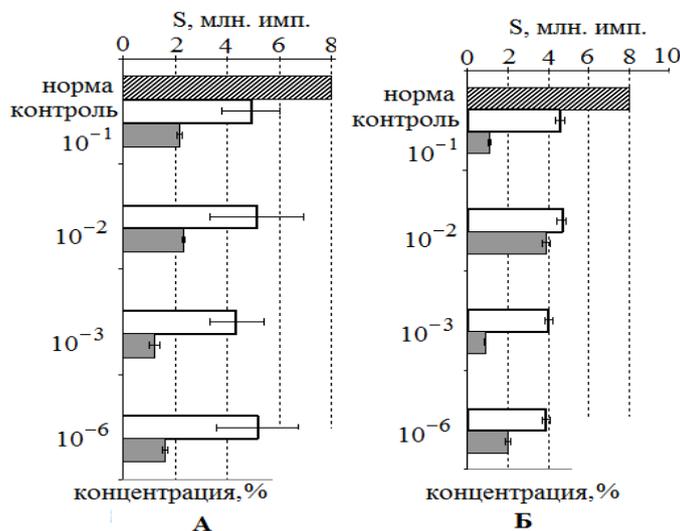


Рис. 4. Влияние различных концентраций эфирного масла лимона на светосумму активированной хемилюминесценции нормореактивных (А) и гипореактивных (Б) фагоцитов крови человека (светлые столбики – люминол, темные – люцигенин)

В то же время при использовании люминола достоверных изменений уровня свободных радикалов в среде не было выявлено. Это означает, что в отличие от ЭМ эвкалипта ЭМ лимона индифферентно ко вторичным радикалам, более реакционноспособным по сравнению с первичными, что снижает возможность ЭМ лимона в качестве эффективного природного средства санации воздушной среды.

Результаты скрининга бактерицидности эфирных масел представлены на рис. 5. В качестве тест-объектов использовались санитарно-показательные микроорганизмы, грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* и грамположительные анаэробные энтеросимбионты-пробиотики *Bifidobacterium*. По результатам определения минимально подавляющей концентрации (МПК) эфирного масла спустя 1 или 15 ч судили о бактерицидных свойствах изучаемых эфирных масел.

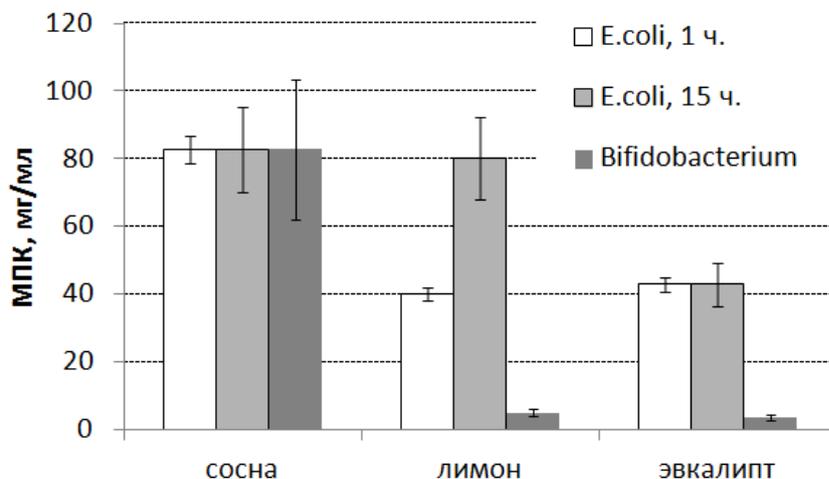


Рис. 5. Подавление роста бактерий под влиянием эфирных масел сосны, лимона и эвкалипта

Судя по величине МПК, санитарно-показательная микрофлора оказалась наименее чувствительной к эфирным маслам сосны, обладающей устойчивыми антиоксидантными свойствами. Эфирное масло лимона (слабый прооксидант) угнетало размножение бактерий, однако эффект был кратковременным (спустя 15 ч обнаружено двукратное увеличение МПК). Бактерицидным эффектом, обнаруженным спустя 1 ч и сохраняющимся спустя 15 ч, характеризовалось влияние эфирного масла эвкалипта, которое по результатам ХЛ-анализа обладало выраженным прооксидантным действием.

Как показали результаты, бактерицидным влиянием обладали (по убыванию эффекта) эфирные масла эвкалипта, лимона и сосны. Значение коэффициента парной корреляции составило величину $-0,874$, что указывает на наличие сильной отрицательной связи между показателями радикалотропности и бактерицидности исследованных масел. Это подтвердило предположение о существовании взаимосвязи радикалотропных и бактерицидных свойств исследованных соединений.

Таким образом, на основании выявленной корреляции можно заключить, что максимальным бактерицидным действием среди исследованных соединений обладают образцы с выраженным прооксидантным влиянием на свободнорадикальный баланс (эфирные масла лимона и эвкалипта), минимальным – эфирное масло сосны, у которого был выявлен устойчивый антиоксидантный характер влияния на свободные радикалы. Полученные результаты позволяют проводить целенаправленный подбор эфирных масел для эффективного бактерицидного использования на основании их радикалотропности, определение которой может быть осуществлено экономичным и экспрессным хемилюминесцентным методом.

Литература

1. Применение ароматических летучих биологически активных веществ растительного происхождения в детских дошкольных учреждениях с целью профилактики респираторных заболеваний / А.А. Андрущук, Л.П. Далецкая, А.Ф. Лебеда [и др.] // Педиатрия. – 1986. – № 8. – С. 44–46.
2. Гольдштейн Н.И. Активные формы кислорода как жизненно необходимые компоненты воздушной среды // Биохимия. – 2002. – Т. 76. – Вып. 2. – С. 194–204.
3. Земсков В.М., Барсуков А.А., Безносенко С.А. Изучение функционального состояния фагоцитов человека (кислородный метаболизма и подвижность клеток). – М.: Ин-т иммунологии МЗ СССР, 1987. – 18 с.
4. Лапин А.А., Зеленков В.Н. К вопросу определения антиоксидантного статуса растений // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: сб. науч. тр. – М.: РАЕН, 2007. – Вып. 14. – С. 43–53.
5. Лебедев К.А. Иммунология в клинической практике: электр. учеб. по медицине. Электронный ресурс: http://medobook.ru/_id/2/69875353.jpg.
6. Николаевский В.В., Еременко А.Е., Иванов И.К. Биологическая активность эфирных масел. – М.: Медицина, 1987.
7. Прудникова С.В., Гукосян В.М., Сарматова Н.И. Руководство для работ по малому практикуму: учеб. пособие / Краснояр. гос. ун-т. – Красноярск, 2004. – 105 с.
8. Эфирные масла – аромат здоровья: Древний и современный опыт профилактики и лечения заболеваний эфирными маслами / С.С. Солдатченко, Г.Ф. Кащенко, А.В. Пидяев [и др.]. – Симферополь: Таврида, 2003. – 192 с.
9. Сотникова О.В., Степень Р.А. Эфирные масла сосны как индикатор загрязнения среды // Химия растительного сырья. – 2001. – № 1. – С. 79–84.
10. Черешнев В.А., Морозова А.А. Экологические аспекты возникновения вирусносительства // Интерн. журн. иммунореабилитации. – 1997. – № 6. – С. 157–163.
11. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. – СПб.: Изд-во Воен.-мед. академии, 2002. – 267 с.