

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СРЕДСТВА

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНАЯ, ЖАРОПОНИЖАЮЩАЯ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ФЛАВANOИДСОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТА АВРАНА ЛЕКАРСТВЕННОГО (*GRATIOLA OFFICINALIS* L.)

Н. В. Полуконова, Н. А. Наволокин, С. В. Райкова, Г. Н. Маслякова,
А. Б. Бучарская, Н. А. Дурнова, Г. М. Шуб¹

Полученный авторским способом, обеспечивающим максимальный выход флавоноидов, экстракт аврана обладает одновременно высокой противовоспалительной, избирательной антимикробной (выраженной в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) и жаропонижающей активностью. Преимуществами предлагаемого лекарственного экстракта служат низкая токсичность, доступность растительного сырья, а также широкий спектр его терапевтических эффектов.

Ключевые слова: авран лекарственный; антимикробная активность; *S. aureus*, *P. aeruginosa*; противовоспалительная активность; жаропонижающее.

ВВЕДЕНИЕ

Принято считать, что разработка лекарственных препаратов, обладающих антимикробной, жаропонижающей и противовоспалительной активностью, является актуальной задачей. Не вызывает сомнений перспективность поиска таких средств, в том числе и среди соединений природного происхождения — многокомпонентных экстрактов лекарственных растений и их сборов [12].

Авран лекарственный (*Gratiola officinalis* L.) — травянистое растение семейства Норичниковые, широко распространённое в Евразии и Северной Америке, использовалось в народной медицине и входило в состав сбора Здренко, как симптоматическое средство при лечении папилломатоза мочевого пузыря. Само растение сильно ядовито, и все полученные ранее извлечения из сырья аврана обладали достаточно высокой токсичностью, поэтому при применении внутрь использовались вместе со слизистыми отварами, с большой осторожностью и под обязательным врачебным контролем [13].

При различных способах извлечений из аврана можно получить биологически активные композиции, обладающие различными свойствами: слабительным, рвотным, спазмолитическим, диуретическим, дигиталисоподобным действием [14], антиоксидантным [6], противоопухолевым и иммуномодулирующим [1, 7, 11]. Жаропонижающая и антимикробная активность у ранее полученных извлечений из аврана была неизвестна.

Цель работы — исследование антимикробной (*in vitro*) и жаропонижающей активности новой флавоно-

идсодержащей композиции из листьев и цветков аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* L.) на модели экспериментального воспаления у лабораторных животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом служило высушенное сырье аврана лекарственного (листья и цветки), собранное на островах р. Волга Саратовской области у пос. Чардым в 2009 г. В работе использован водный раствор сухого спиртового экстракта цветков и листьев аврана лекарственного, полученного авторским способом, обеспечивающим максимальный выход флавоноидов, и имеющий состав, представленный фенольными соединениями, в частности, неизвестного ранее для этого растения биофлавоноида — кверцетина (способ получения и химический состав описаны в патенте РФ № 2482863) [8]. Среднее содержание кверцетина в данном экстракте с использованием градуировочного графика стандартного образца кверцетина (98 %) Sigma составляет 0,66 %. Установленное нами методом жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) количество кверцетина в сухом остатке экстрактивных веществ (получаемого из 10 г сухой травы аврана) составило 350 мкг [8]. По сравнению с ранее предлагаемыми извлечениями из травы аврана полученный нами упаренный экстракт в исследуемых дозах нетоксичен, что было подтверждено ранее в экспериментах на крысах [5, 10].

Установление класса токсичности водного раствора упаренного экстракта аврана проводили на основе определения LD₅₀ на лабораторных белых мышах (центральный питомник лабораторных животных РАМН). Каждая из 4 групп вместе с контролем состояла из 6 мышей массой 25–30 г. Водный раствор экстракта аврана в дозах 1700, 4000, 4475 мг/кг вводили однократно

¹ ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им В. И. Разумовского» Минздрава РФ, 410012, Саратов, ГСП, ул. Большая Казачья, 112.

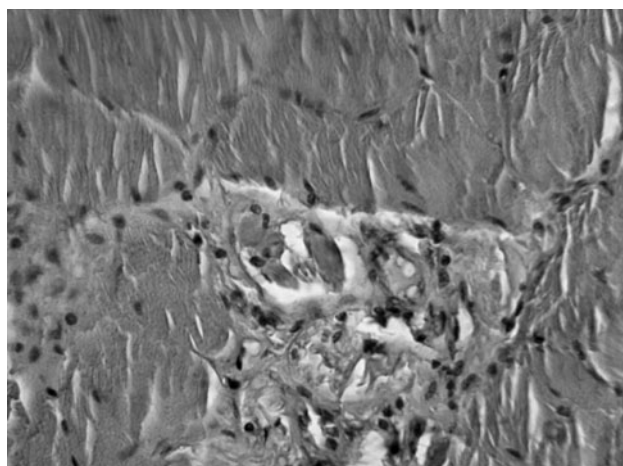


Рис. 1. Участок некробиоза и инфильтрации мышцы сегментоядерными нейтрофилами. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. 600.

но внутрибрюшинно, наблюдение за животными проводили в течение 1 сут. Доза указана в мг сухого экстракта.

Определение LD у крыс проводили в 4 группах по 6 животных, в 1-й и 2-й группах раствор экстракта вводили внутримышечно (в дозе 1323 мг/кг), в 3-й группе — внутрибрюшинно (1663 мг/кг), 4-я группа служила контролем. В течение 1 сут проводили оценку состояния животных по 4-балльной шкале по показателям: состояние шерсти, двигательная активность, болевая реакция, изменение мышечного тонуса, число почесываний за 1 мин, температура тела [10]. Крыс 2-й группы выводили из эксперимента через 1 сут декапитацией для забора мышц и определения в них изменений после внутримышечного введения раствора экстракта аврана. Класс токсичности определяли в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 и СанПиНом 2.1.4.1074-01.

Работу с лабораторными животными осуществляли согласно протоколу исследований по [10] в соответствии с Международными руководствами и принципами биомедицинских исследований с участием животных (1 декабря 2012).

Исследование противовоспалительной и жаропонижающей активности водного раствора сухого экстракта аврана проводили согласно методическим указаниям Фармакологического комитета МЗ РФ с использованием “формалиновой” модели воспаления [8, 9]. Эксперименты проводили на 30 белых беспородных крысах-самцах линии Вистар (центральный питомник лабораторных животных РАМН) со средней массой $163,5 \pm 6,8$ г. Всем животным предварительно вводили субплантарно (в апоневроз левой задней конечности) в качестве флогенного агента 0,1 мл 3 % раствора формалина, правая задняя лапа служила контролем. Затем животные были разделены на 3 группы по 10 крыс в каждой: 1-я — контрольная группа без лечения; 2-я — группа сравнения, в которой крысам однократно сразу после введения формалина внутримышечно вво-

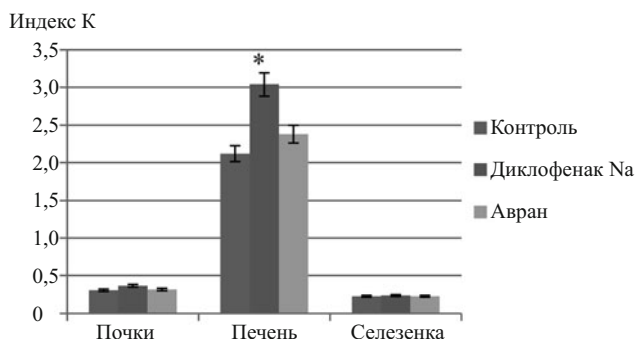


Рис. 2. Показатели индекса массы органов (K) крыс через 24 ч после введения противовоспалительных препаратов (диклофенак натрия в дозе 3 мг/кг, аврана в дозе 70 мг/кг).

* — различия значимы с контролем при $p < 0,05$.

дили раствор диклофенак натрия (в качестве стандартного противовоспалительного агента) в дозе 3 мг/кг; 3-я группа — опытная: однократно внутримышечно вводили водный раствора упаренного экстракта аврана лекарственного в дозе 70 мг/кг. Через 1, 2, 3 и 24 ч после введения флогенного агента о жаропонижающем эффекте судили по снижению ректальной температуры, о противовоспалительном — по снижению степени выраженности отека стопы задней конечности животных, а также по изменению лейкоцитарной формулы.

Из эксперимента животных выводили через 24 ч после его начала, забирали и взвешивали внутренние органы, мышцу (место инъекции), рассчитывали индекс K — индекс массы органа ($K = m_{\text{орг.}}/m_{\text{жив.}} \cdot 100$) для печени, почек и селезенки.

Определение противомикробного действия препаратов для *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835, *Escherichia coli* ATCC 25922 из музея живых культур кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО Саратовского ГМУ им. В. И. Разумовского, проводили по методике, рекомендованной Государственной фармакопеей (ГФ) 11 издания (ГФ СССР, 1989). Чувствительность бактерий определяли методом двукратных серийных разведений в среде Мюллер-Хинтона. Гото-

Противомикробная активность водного раствора экстракта аврана

Вид бактерий	Концентрация водного раствора упаренного экстракта аврана, мг/мл						
	337,5	225	135	75	39,71	20,45	10,38
<i>E. coli</i>	–	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	–	±	±	±	+	+	+
<i>S. aureus</i>	–	–	–	–	–	±	+

Примечание: “–” — полное отсутствие роста культуры (бактерицидное действие), “±” — количество колоний такое же, как в контроле (бактериостатическое действие), “+” — рост культуры превышает рост в контроле.

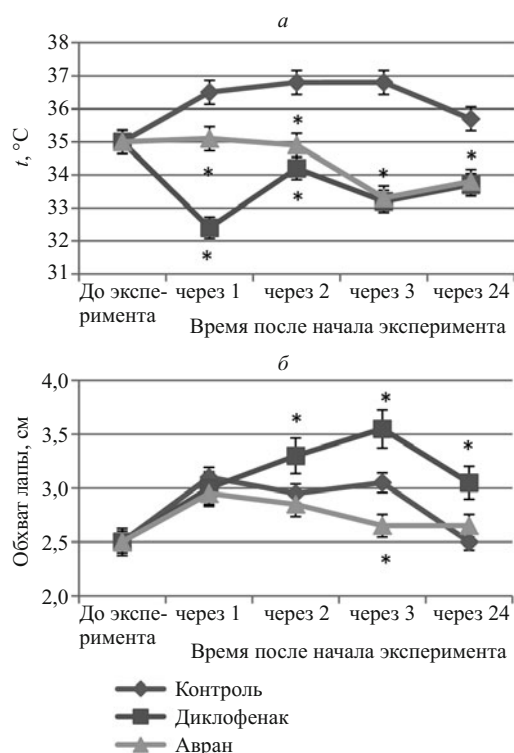


Рис. 3. Сравнение жаропонижающего и противошокового эффектов экстракта аврана и диклофенака: *а*) динамика ректальной температуры крыс в течении 24 ч после введения противовоспалительных препаратов (диклофенака натрия в дозе 3 мг/кг, аврана в дозе 70 мг/кг); *б*) динамика объёма лапы крыс в течении 24 ч после введения противовоспалительных препаратов (диклофенака натрия в дозе 3 мг/кг, аврана в дозе 70 мг/кг).

* — различия значимы с контролем при $p < 0,05$.

вили ряд последовательных разведений с концентрацией препарата от 337,5 до 10,38 мг/мл в объеме 0,9 мл. Штаммы микроорганизмов предварительно культивировали в течение 24 ч в термостате на скошенном агаре. Из суточных культур исследуемых штаммов готовили взвесь по стандарту мутности McFarland 0,5, доводя до концентрации $2 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. В каждую пробирку с разведением экстракта вносили по 0,1 мл приготовленной бактериальной взвеси. Эксперимент сопровождался контрольными посевами микроорганизмов — без исследуемого экстракта. Для определения эффекта антимикробного действия из контрольных пробирок до начала инкубации проводили мерный высев на плотную питательную среду для подсчета выросших колоний. Посевы инкубировали в термостате при температуре 35 °C в течение 20–24 ч. В ряду разведений препарата отмечали пробирку с наименьшей концентрацией экстракта, в которой отсутствовал рост бактерий. Количество вещества в этой пробирке расценивалось как минимальная подавляющая концентрация (МПК). Из пробирок, в которых отсутствовал видимый рост бактерий, производили мерный высев на плотные питательные среды и инкубировали в термостате 20–24 ч. Ко-

личество выросших колоний сравнивали с количеством колоний, выросших из контрольных пробирок. Если количество колоний было меньше в 2–3 раза по сравнению с контролем, характер антимикробного действия расценивался как бактерицидный, если количество колоний при высевах из контрольной и опытной пробирок было равным — как бактериостатический.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью общепринятых методов медико-биологической статистики в программе SPSS 17.0 с вычислением медианы, максимума и минимума, значимость различий при непараметрическом распределении определяли при помощи критерия Мозеса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Токсичность водного раствора сухого экстракта аврана

Гибель мышей при разных дозах экстракта аврана, полученная в эксперименте, составила: 0 % при 1700 мг/кг; 80 % при 4000 мг/кг; 100 % при 4475 мг/кг. Летальные дозы экстрактов аврана у мышей, определенные с помощью пробит-анализа, составили: LD_{10} – 1778 мг/кг; LD_{16} – 1905 мг/кг; LD_{50} – 2375 мг/кг; LD_{84} – 4100 мг/кг; LD_{100} – 4475 мг/кг. Максимальная доза экстракта аврана, введение в которой не сопровождается гибелью животных, составляет 1700 мг/кг. Согласно классификации вредных веществ по степени токсичности и опасности исследуемый экстракт относится к IV классу токсичности (малотоксичные вещества), LD_{50} (мг/кг) при введении внутрь составляет > 1500 мг/кг (по СН 245-71). Используемые нами дозы экстракта у крыс (1323 и 1663 мг/кг) не вызвали гибели животных и, согласно ГОСТу 12.1.007-76 и СанПиНу 2.1.4.1074-01, полученный экстракт можно отнести к малоопасным химическим веществам. В месте введения экстракта аврана в дозе 1323 мг/кг, которая превышала терапевтическую дозу (70 мг/кг) в 19 раз, определяли единичные участки некробиоза и выраженную инфильтрацию мышцы и жировой клетчатки сегментоядерными нейтрофилами (рис. 1). Все развивающиеся изменения обратимы и локальны, это позволяет сделать вывод, что при терапевтической дозировке изменения будут еще менее выражены или отсутствовать. Аналогичные изменения описываются и в инструкции по применению диклофенака натрия и считаются допустимыми при внутримышечном введении средств данной группы [4].

Установлено, что диклофенак натрия в дозе 3 мг/кг вызывает у животных увеличение индекса массы печени, по сравнению с контролем на 30 % ($p < 0,05$). При введении экстракта аврана (рис. 2) не наблюдали значимых изменений индекса массы органов по сравнению с контролем, что свидетельствует о более низкой органотоксичности экстракта по сравнению с диклофенаком натрия и отсутствием токсического влияния на почки и селезенку.

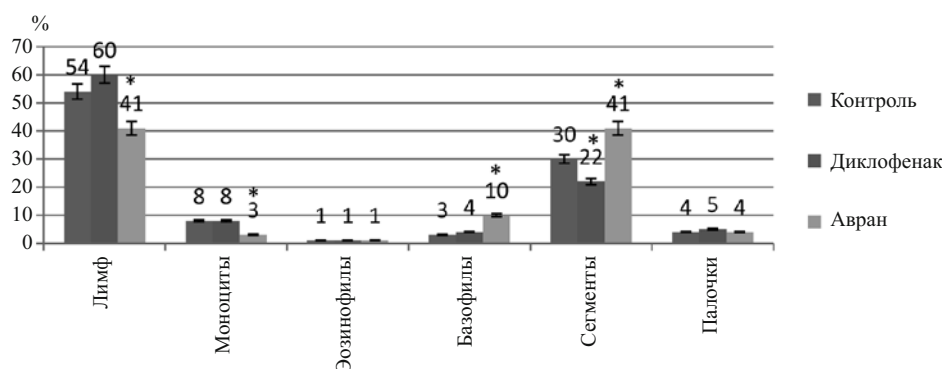


Рис. 4. Изменение показателей лейкоформулы лабораторных крыс через 24 ч после введения противовоспалительных препаратов (диклофенака натрия в дозе 3 мг/кг, аврана в дозе 70 мг/кг).

* — различия значимы по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Жаропонижающая и противовоспалительная активность

Установлено, что средняя ректальная температура у крыс до начала эксперимента составила $35,0 \pm 0,5$ °C, что соответствует параметрам средней видовой нормы. В контрольной группе на фоне введения флогогенного агента температура начинала повышаться, через 2 ч достигала максимума (38 °C) и сохранялась повышенной до 24 ч. В группе сравнения на фоне введения флогогенного агента и диклофенака натрия температура изменялась зигзагообразно: максимальное снижение наблюдалось через 1 ч после начала эксперимента, затем через 2 ч она повышалась, достигая практически нормальных цифр, после чего вновь наблюдалось снижение температуры с постепенным восстановлением исходных значений к концу эксперимента.

В опытной группе на фоне введения флогогенного агента и водного раствора экстракта аврана температура животных в течение первых 2 ч не изменялась, через 3 ч происходило достоверное снижение температуры до значений, сопоставимых с теми же показателями при введении диклофенака, и дальнейшая динамика температуры была аналогичной динамике изменения температуры в группе животных при введении диклофенака натрия (рис. 3, а).

Противовоспалительная активность

Противоотечный эффект экстракта начинает проявляться через 1 ч после введения, достигает максимума через 3 ч, статистически достоверно отличаясь от контроля и группы сравнения с диклофенаком ($p < 0,05$) (рис. 3, б). Данный эффект экстракта стабильно сохраняется и через 24 ч от начала эксперимента.

Получены значимые изменения по ряду показателей периферической крови через сутки после введения диклофенака натрия и экстракта (рис. 4). Содержание моноцитов в лейкоформуле у животных, получавших раствор экстракта аврана, было снижено по сравнению с контрольной группой, что, вероятно, свидетельствует о быстрой миграции моноцитов в ткани. Известно, что моноциты после созревания выходят в пе-

риферическое русло кровотока и циркулируют в крови от 36 до 104 ч, после чего мигрируют в ткани, где и происходит их дальнейшая дифференцировка в тканевые макрофаги, выполняющие основные функции фагоцитарной защиты организма от микробной инфекции; участия в иммунном ответе организма и воспаления и др. По-видимому, под влиянием экстракта аврана ускоряются процессы иммунного ответа организма в ответ на альтерацию.

Содержание базофилов в группе животных, получавших раствор экстракта аврана (рис. 4), возросло по сравнению с другими группами ($p < 0,05$). Количество сегментоядерных нейтрофилов по сравнению с контролем при введении диклофенака уменьшалось, что согласуется с известными представлениями о влиянии на кровь НПВС. При введении аврана количество сегментоядерных нейтрофилов возрастает в 1,3 по сравнению с контролем, что говорит о повышении и активации неспецифических механизмов защиты крови ($p < 0,05$).

Антимикробная активность экстракта аврана

Установлено наличие антимикробного действия водного раствора экстракта в отношении испытуемых видов микроорганизмов (таблица).

Наибольшую активность водный раствор экстракта аврана продемонстрировал в отношении *S. aureus*: минимальная подавляющая концентрация (МПК) составила 20,45 мг/мл (при этом отмечали бактериостатический эффект). В более высоких концентрациях (135 мг/мл и выше) экстракт обладал бактерицидным действием в отношении золотистого стафилококка. В отношении *P. aeruginosa* МПК составила 75 мг/мл, при этом только в максимальной концентрации (337,5 мг/мл) отмечено бактерицидное действие этого препарата. Наименьшее антимикробное действие экстракт проявил в отношении *E. coli*: МПК составила 337,5 мг/мл (в отношении кишечной палочки эта концентрация экстракта обладает бактерицидным эффектом).

Таким образом, согласно классификации вредных веществ по степени токсичности и опасности исследуемый экстракт аврана относится к IV классу токсичности (малотоксичные вещества), LD₅₀ (мг/кг) при введении внутрь составляет > 1500 мг/кг (по СН 245 – 71). Используемые нами дозы экстракта у крыс (1323 и 1663 мг/кг) не вызвали гибели животных, и согласно ГОСТу 12.1.007-76 и СанПиНу 2.1.4.1074-01 полученный экстракт можно отнести к малоопасным химическим веществам. При введении экстракта аврана в дозе 70 мг/кг не наблюдали значимых изменений индекса массы органов по сравнению с контролем, что свидетельствует о более низкой гепатотоксичности экстракта по сравнению с диклофенаком натрия (в 1,25 раз меньше гепатотоксичность экстракта аврана) и отсутствием токсического влияния на почки и селезенку. При введении аврана количество сегментоядерных нейтрофилов возрастает в 1,3 по сравнению с контролем, что говорит о повышении и активации неспецифических механизмов защиты ($p < 0,05$).

Выявлен существенный и достаточно длительный противоотечный эффект экстракта на фоне введения флогогенного агента, превышающий в 1,2 раза подобное действие диклофенака натрия ($p < 0,05$).

Определен жаропонижающий эффект экстракта на фоне введения флогогенного агента. При этом экстракт начинает действовать сразу с момента введения, животные сохраняют температуру нормальной в течение 2 ч с последующим ее снижением через 3 ч и сохранением эффекта до 24 ч после введения ($p < 0,05$).

Установлена избирательная активность водного раствора экстракта аврана в отношении *P. aeruginosa*, *S. aureus*, при этом наименьшая активность отмечена для условно патогенного штамма кишечной палочки.

ВЫВОД

Полученный по авторской методике экстракт аврана лекарственного обладает одновременно высокой противовоспалительной, избирательной антимикробной и жаропонижающей активностью. Преимуществами предлагаемого лекарственного экстракта служат его низкая токсичность и доступность растительного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. П. Байтман, Н. А. Наволокин, *Бюл. мед. интернет-конференций*, **3**(2), 374 (2013).
2. *ГФ СССР: Вып. 2*, Медицина, Москва (1989).
3. И. Ф. Крылов, Ю. В. Буров, Г. П. Вышковский и др., *Регистр лекарственных средств в России*, ИНФАРМХИМ, Москва (1993).
4. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Т. 1 – 2, Медицина, Москва (1986).
5. Н. А. Наволокин, А. В. Павлова, *Бюл. мед. интернет-конференций*, **2**(2), 82 (2012).
6. Н. А. Наволокин, Н. В. Полуконова, Г. Н. Маслякова и др., *Саратовский научно-мед. журн.*, **9**(2), 213 – 220 (2013).
7. А. В. Полуконова, Н. А. Наволокин, О. А. Бибикова, *Бюл. мед. интернет-конференций*, **3**(2), 375 (2013).
8. Н. В. Полуконова, Н. А. Дурнова, М. Н. Курчатова и др., *Химия растит. сырья*, № 4, 165 – 173 (2013).
9. Г. Я. Шварц, Р. Д. Слюбаев, *Ведомости Научного центра экспертизы и госконтроля лек. средств МЗ РФ*, № 1, 44 – 50 (2000).
10. В. П. Фисенко, Е. В. Арзамасцев, Э. А. Бабаян и др., *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, ЗАО “ИИА Ремедиум”, Москва (2000).
11. N. A. Navolokin, N. V. Polukonova, G. N. Maslyakova, et al., *Rus. Open Med. J.*, **2**(1), 0203 (2012).
12. S. Darshan, R. Doreswamy, *Phytother. Res.*, **18**, 343 – 357 (2004).
13. http://www.ayzdorov.ru/tvtravnik_avran.php
14. <http://www.dorogaistin.ru>index.php>

Поступила 11.07.14

ANTI-INFLAMMATORY, ANTIPYRETIC AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF FLAVONOID-CONTAINING EXTRACT OF *GRATIOLA OFFICINALIS* L.

N. V. Polukonova, N. A. Navolokin, S. V. Raikova, G. N. Maslyakova, A. B. Bucharskaya, N. A. Durnovan, and G. M. Shub

V. I. Razumovsky Saratov State Medical University, ul. Bol'shaya Kazach'ya 112, Saratov, 410012 Russia

The extract of *Gratiola officinalis* L. has been obtained by an original method ensuring the maximum yield of flavonoids. The extract simultaneously exhibits high anti-inflammatory activity, selective antimicrobial properties (with respect to *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, but not to conditionally pathogenic *E. coli*) and antipyretic effect (observed for the first time in *Gratiola officinalis* L. preparations). Advantages of the proposed preparation are low toxicity, availability of the raw material, and broad spectrum of therapeutic effects.

Keywords: *Gratiola officinalis* L. extract, antimicrobial activity, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, anti-inflammatory activity, antipyretic activity