

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ КИЗИЛА ЛИСТЬЕВ ЭКСТРАКТА ЖИДКОГО

Шаталова Т.А.¹, Кулешова С.А.¹, Мичник Л.А.¹, Мичник О.В.¹, Саджая Л.А.¹, Айрапетова А.Ю.¹, Погорелов В.И.¹, Ляхова Н.С.¹, Луговой И.С.¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт Пятигорский филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», Пятигорск, Россия (357500, г. Пятигорск, пр. Калинина, дом 11), e-mail: shata61@bk.ru

Целью данной работы является изучение антимикробного, мочегонного действия, острой токсичности кизила листьев экстракта жидкого. Кизила листьев экстракт жидкий получали методом противоточного многоступенчатого экстрагирования в батарее из шести диффузоров при соотношении фаз 1:2 с использованием 70%-ного этилового спирта. Результаты проведенных микробиологических исследований показали, что кизила экстракт в нативном виде, а также в разведениях (до 1:10) обладает высокой антимикробной активностью в отношении кокковой флоры, энтеро- и спорообразующих бактерий, грибов, превосходит по действию настойку зверобоя. Он может быть использован для лечения инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Выявлено наличие мягкого диуретического эффекта у кизила экстракта жидкого в дозе 1 мл на 1 кг веса, что сопоставимо с действием леспефрила. Комплекс биологически активных веществ кизила экстракта, при пероральном введении, относится к малоопасным веществам или веществам 4 класса токсичности. Токсичность кизила листьев экстракта жидкого связана с токсичностью 64%-ного спирта этилового.

Ключевые слова: листья кизила, экстракт листьев кизила жидкий, антимикробное и мочегонное действие, острая токсичность, комплекс биологически активных веществ кизила листьев экстракта.

THE STUDY OF BIOLOGICAL EFFECT OF CORNELL LEAVES LIQUID EXTRACT

Shatalova T.A.¹, Kuleshova S. A.¹, Michnik L.A.¹, Michnik O. V.¹, Sadzhaya L.A.¹, Ayrapetova A.Y.¹, Pogorelov V. I.¹, Lyakhova N.S.¹, Lugovoi I.S.¹

Pyatigorsk medical and pharmaceutical institute, Pyatigorsk branch of the SBEI of HPE Volgograd state medical university, Pyatigorsk, Russia (11, Kalinin ave, Pyatigorsk 357500)e-mail: shata61@bk.ru

The purpose of this work is to study antimicrobial, diuretic action, acute toxicity of a cornel leaves liquid extract. Cornel leaves liquid extract was obtained by the method of counterflow multistage extraction in the battery of six diffuzors at a phases ratio of 1:2 with the use of 70% ethyl alcohol. The results of the conducted microbiological researches showed that the cornel extract in the primary form, and also in dilutions (up to 1:10) possessed high antimicrobial effect towards coccal flora, enterobacteria, spore forming bacteria and mushrooms which surpasses Hypericum tincture in activity. It can be used to treat some infectious diseases of gastrointestinal tract. Soft diuretic effect of in a dose of 1 ml per 1 kg of weight which is comparable to an action of Lespefril was revealed. The complex of biologically active agents of the cornel extract, at per os application, belongs to a low hazard substances or substances of the 4th class of toxicity. The toxicity of the cornel leaves liquid extract is due to the toxicity of 64% of ethyl alcohol.

Keywords: cornel leaves, cornel leaves liquid extract, antimicrobial and diuretic action, acute toxicity, complex of biologically active agents of the cornel leaves liquid extract.

Введение

Кизил мужской (*Cornus mas* L., сем. Кизиловые - Cornaceae) издавна известен как плодое растение с ценными лекарственными свойствами. Листья кизила содержат: иридоиды (секологанин 0,1%), фенолкарбоновые кислоты, витамин С, дубильные вещества – до 17,6%, флавоноиды (рутин, кверцетин, кемпферол), проантоцианидины [4]. Ранее нами была разработана технология кизила листьев экстракта жидкого, представляющая собой противоточное многоступенчатое экстрагирование в батарее из шести диффузоров при

соотношении фаз 1:2 с использованием в качестве экстрагента 70%-ного этилового спирта [5]. Настой из листьев кизила используется в народной медицине как антимикробное средство при желудочно-кишечных расстройствах и лечении различных ран, а также как мочегонное и противовоспалительное средство.

Целью данной работы является изучение острой токсичности, мочегонного, антимикробного действия кизила листьев экстракта жидкого.

Материал и методика. В качестве объекта исследования использовали жидкий экстракт листьев кизила 1:2 (экстрагент 70%-ный этиловый спирт, показатели качества экстракта: содержание флавоноидов, в пересчете на рутин, $0,52 \pm 0,01\%$; плотность экстракта $0,922 \text{ г/см}^3$; сухой остаток – $8,02 \pm 0,28\%$; содержание спирта этилового в экстракте не менее 64%) [5].

Диуретическое действие [6] кизила листьев экстракта жидкого изучалось на белых крысах мужского пола линии Wistar массой 200-240 г. Животные содержались на обычном рационе в стандартных условиях вивария. В день, предшествующий эксперименту, крысы не получали пищу и воду. Использовались три группы крыс по 6 в каждой группе. Первая группа была контрольной и получала воду очищенную. Исследуемый экстракт и препарат сравнения (леспефрил) вводили перорально крысам второй и третьей групп соответственно. Вводимый объём составлял 1 мл. Затем производили водную нагрузку (из расчета 25 мл на 1 кг веса через желудочный зонд). После введения вещества животных помещали в клетки для изучения общего обмена и в течение 4 ч проводили учёт диуреза. Острую токсичность кизила экстракта жидкого определяли по методу Кербера [3]. Условия проведения опыта соответствовали рекомендациям Фармакологического комитета [6; 7]. Испытания проводили на интактных мышах обоего пола массой 19,0-21,0 г. Экстракт вводили животным непосредственно в желудок с помощью зонда с оливой на конце. Кизила листьев экстракт жидкий вводили в возрастающих дозах. В качестве контроля использовали спирт этиловый 64%-ный. Расчеты LD_{50} проводили по формуле: $LD_{50} = LD_{100} - \sum \frac{zd}{m}$; где LD_{100} - доза, вызывающая гибель всех животных, мл/кг; z - показатель разницы между количеством погибших животных при использовании двух соседних доз; d - интервал между каждыми двумя смежными дозами, мл/кг; m - число животных в каждой группе ($m=6$).

Для определения острой токсичности самого комплекса биологически активных веществ (БАВ) кизила листьев экстракта жидкого, спирт этиловый из экстракта отгоняли под вакуумом и комплекс БАВ досушивали в вакуум-сушильном шкафу при температуре не выше 40°C . В предварительном эксперименте на ограниченном количестве животных

определяли ориентировочный диапазон доз, вызывающий гибель животных. Он находился в интервале от 5000 до 10000 мг/кг массы. В заключительном эксперименте нами были изучены дозы с шагом 1000 мг/кг. Белым мышам массой 18-20 г внутрь, через зонд, вводили по 0,5 мл водного раствора БАВ (1:10) повторно с интервалом в 3 часа. На каждую дозу брали по 6 животных. За животными наблюдали в течение 14 дней. Регистрировали их внешний вид, поведение и явления, при которых происходила их гибель.

В настоящее время промышленностью выпускается настойка зверобоя, которая применяется внутрь и наружно как антимикробное средство. Поэтому антимикробное действие кизила экстракта жидкого изучали в сравнении с настойкой зверобоя и спиртом этиловым 64%-ным. Для культивирования микроорганизмов использовали питательные среды (ПС), рекомендованные Государственной фармакопеей [2]. ПС № 1 – для *Bacillus anthracoides*; № 2 – для *Candida albicans*, *Aspergillus niger*; № 3 – для бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (*Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* 266); № 8 - для *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* L₂.

Для выяснения активности исследуемые препараты (экстракт кизила жидкий, настойка зверобоя, спирт этиловый 64%-ный) разводили в фосфатном буферном растворе (ФБР) в соотношении 1:1, 1:5, 1:10. Определение антимикробной активности экстракта кизила мужского проводили методом диффузии в агар (способ «колодцев»). Метод основан на оценке угнетения роста тест-микроорганизма определёнными концентрациями испытуемого средства [2]. Для проверки антимикробной активности использовали 24-часовые тест-культуры, выращенные на соответствующих питательных средах, рекомендованных Государственной фармакопеей [2],: № 1 – для *Bacillus anthracoides*; № 2 – для *Candida albicans*, *Aspergillus niger*; № 3 – для бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (*Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* 266); № 8 - для *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* L₂). Микробные культуры с питательных сред смывали фосфатным буферным раствором и готовили взвесь, содержащую 500 млн микробных тел в 1 мл по стандарту мутности. Разведение *Aspergillus niger* проводили в фосфатном буферном растворе с добавлением твина-80. На поверхность питательных сред в чашках Петри одинакового диаметра проводили посев сплошным газоном стандартных взвесей используемых тест-культур. Для этого 2 мл взвеси помещали в чашку Петри, взвесь равномерно распределяли по поверхности, а излишки взвеси полностью удаляли. Стерильным сверлом диаметром 6 мм делали 6 лунок («колодцев») на расстоянии 2,5 см от центра и на одинаковом расстоянии друг от друга. В три лунки через одну вносили 0,1 мл испытуемого вещества в соответствующем разведении, а в три оставшиеся лунки -

растворитель в соответствующей концентрации (контроль). Под крышку чашки Петри помещали стерильный фильтр во избежание попадания конденсата на лунки. Все чашки Петри ставили в термостат строго горизонтально для получения круглых зон угнетения роста микрофлоры, инкубировали при температуре 35 ± 2 °С в течение суток (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthraxoides*; *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* 266; *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* L2) или в течение 4 суток (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*) при температуре 30 ± 2 °С. После инкубации диаметр зон угнетения роста измеряли с помощью миллиметровой линейки. Оценка результатов проводилась по диаметру зон задержки роста вокруг «колодца», включая диаметр самого «колодца»: отсутствие зоны задержки роста - испытываемая культура не чувствительна к данной концентрации препарата; диаметр зоны задержки роста 10 мм - умеренная чувствительность культуры к данной концентрации препарата; диаметр зоны роста более 10 мм - высокая чувствительность испытываемой культуры к данной концентрации препарата.

Результаты и их обсуждение. Результаты определения диуретической активности экстракта листьев кизила жидкого были обработаны статистически при помощи программного пакета Microsoft Excel 2000 для независимых рядов с достоверностью $p < 0,05$ и представлены в таблице 1 и на рисунке.

Таблица 1 - Влияние кизила листьев экстракта жидкого на диурез крыс $M \pm m$, p

Исследуемый объект	Объём мочи /ед.веса/время, мл/кг/мин					
	30´	45´	60´	120´	180´	240´
Контроль (вода очищенная)	0,00±0,00	0,55±0,08	3,18±0,38	3,82±0,42	3,91±0,45	3,91±0,45
Леспефрил	3,60±0,32*	4,82±0,42*	7,18±0,62*	9,09±0,68*	10,00±0,67*	11,27±0,76*
Кизила листьев экстракт жидкий	0,00±0,00	2,27±0,22*	6,14±0,44*	8,73±0,62*	8,73±0,62*	9,10±0,83*

Примечание: * - $p < 0,05$ - достоверно относительно контроля

Результаты исследований, представленные в таблице 1, показывают, что через 30 минут диурез наблюдали только у животных, получавших леспефрил. К 60-й минуте объём мочи на фоне леспефрила и кизила листьев экстракта превышал контроль на 125% и 93% соответственно (рисунок 1). Через 120 минут результат изменился на 134% и 128% относительно контроля при применении леспефрила и изучаемого экстракта соответственно.

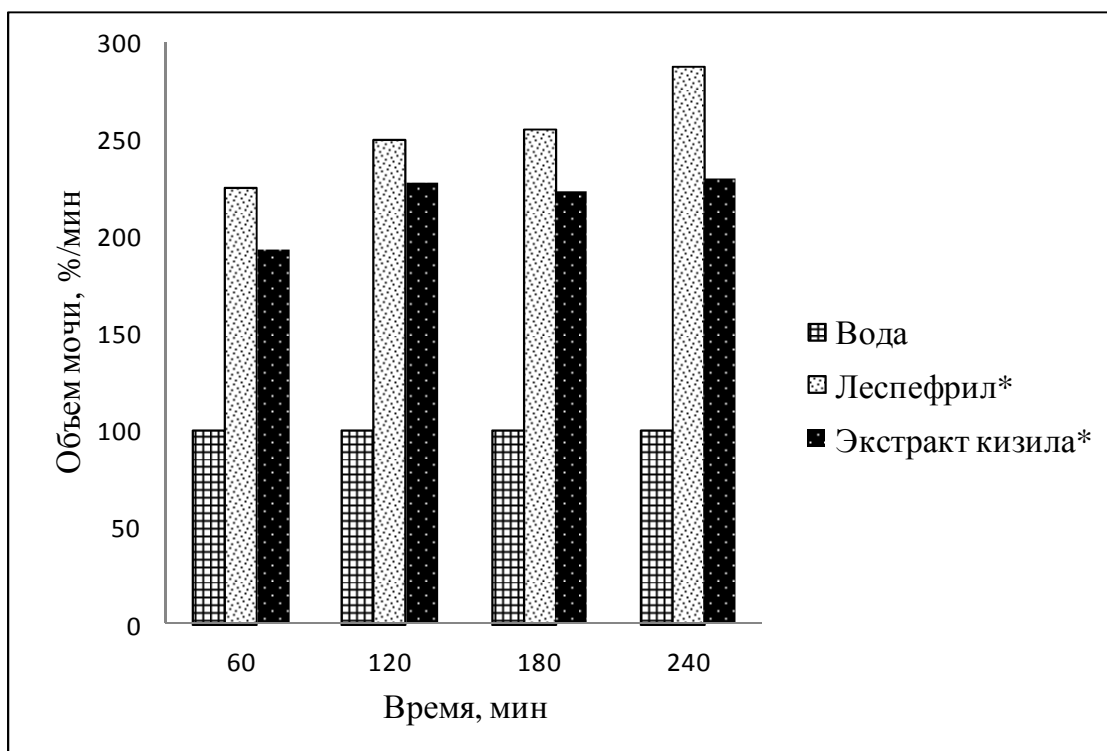


Рисунок 1 – Влияние кизила экстракта жидкого на диурез у крыс (* - $p < 0,05$ относительно воды)

К окончанию опыта объём мочи, полученной от животных, которым вводили леспефрил, составил $11,27 \pm 0,76$ мл, что на 188% превышало контрольные данные. На фоне экстракта из листьев кизила объём мочи составил $9,10 \pm 0,83$ мл, что на 133% выше объёма мочи животных, которым вводили воду. Сравнительный анализ результатов применения кизила экстракта жидкого и леспефрила показал, что диурез на фоне леспефрила в среднем на 32% выше, чем при введении кизила листьев экстракта жидкого. Изменения количества мочи при применении кизила листьев экстракта жидкого в сравнении с результатом леспефрила носили недостоверный характер.

Результаты исследования острой токсичности спирта этилового 64%-ного и кизила листьев экстракта жидкого представлены в таблицах 2, 3.

Таблица 2 - Результаты исследования острой токсичности спирта этилового 64%-ного ($m=6$)

Дозы, мл/кг	5	10	15	20	25	30
Выжило	6	5	2	1	1	0
Погибло	0	1	4	5	5	6
z	1	3	1	0	1	
d	5	5	5	5	5	5
zd	5	15	5	0	5	

Для спирта этилового 64%-ного $LD_{50} = 30 - \frac{30}{6} = 30 - 5 = 25,0 \text{ мл/кг}$

Таблица 3 - Результаты исследования острой токсичности кизила листьев экстракта жидкого

(m=6)

Дозы, мл/кг	5	10	15	20	25	30
Выжило	6	4	3	2	1	0
Погибло	0	2	3	4	5	6
z	2	1	1	1	1	1
d	5	5	5	5	5	5
zd	10	5	5	5	5	5

Для кизила листьев экстракта жидкого $LD_{50} = 30 - \frac{30}{6} = 30 - 5 = 25,0 \text{ мл / кг}$

Из результатов эксперимента, представленных в таблицах 2, 3, следует, что токсичность кизила экстракта жидкого связана с токсичностью 64%-ного спирта этилового. Результаты исследования острой токсичности комплекса БАВ кизила экстракта представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты исследования острой токсичности комплекса БАВ кизила экстракта

(m=6)

Дозы, мг/кг	5000	6000	7000	8000	9000	10000
Выжило	6	5	4	3	2	0
Погибло	0	1	2	3	5	6
z	1	1	1	2	1	
d	1000	1000	1000	1000	1000	
zd	1000	1000	1000	2000	1000	

Для комплекса БАВ кизила экстракта (высушенного) $LD_{50} = 10000 - \frac{6000}{6} = 9000 \text{ мг / кг}$

Острая токсичность комплекса БАВ кизила листьев экстракта составила 9000 мг/кг массы животных. Комплекс БАВ кизила экстракта, при пероральном введении, относится к малоопасным веществам или веществам 4 класса токсичности [1] и является безопасным для человека. Безопасность кизила листьев экстракта жидкого будет зависеть от принятой дозы.

Результаты по изучению антимикробной активности кизила листьев экстракта жидкого (КЭ) и зверобоя настойки (ЗН) представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Антимикробное действие кизила листьев экстракта жидкого и зверобоя настойки

Состав лунок	Диаметр зоны задержки роста тест-культур микроорганизмов, мм (средние значения)														
	1*	2*	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*	11*	12*	13*	14*	15*
Контроль 1 ¹	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ЗН	14	12	12	11	15	12	19	15	15	10	12	13	8	7	7
КЭ	20	20	20	22	22	18	24	20	20	18	18	18	20	21	22
Контроль 2 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ЗН + ФБР (1:1)	12	9	9	10	11	10	17	13	12	8	11	11	5	6	6
КЭ + ФБР (1:1)	15	15	15	16	17	13	20	17	17	12	14	15	15	16	17
Контроль 3 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ЗН + ФБР (1:5)	9	7	7	8	9	8	13	11	9	6	9	9	4	4	3
КЭ + ФБР (1:5)	11	12	11	12	13	11	16	12	13	10	11	13	11	12	14
Контроль 4 ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ЗН+ ФБР (1:10)	7	5	5	6	7	6	11	9	7	4	6	6	2	2	-
КЭ +ФБР (1:10)	11	12	11	12	13	11	16	12	13	10	11	13	11	12	14

Примечание: контроль 1¹ - спирт этиловый 64%-ный; контроль 2² - спирт этиловый 64% + ФБР (1:1); контроль 3³ - спирт этиловый 70%-ный + ФБР (1:5); контроль 4⁴ - спирт этиловый 64%-ный + ФБР (1:10); * -тест-культуры: 1) *Staphylococcus aureus* (209); 2) *Staphylococcus aureus* (Макаров); 3) *Staphylococcus aureus* (Type); 4) *Staphylococcus epidermidis* Wood-46; 5) *Escherichia coli* 675; 6) *Escherichia coli* 055; 7) *Escherichia paracoli*; 8) *Salmonella typhimurium*; 9) *Shigella flexneri* 266; 10) *Bacillus subtilis* L₂; 11) *Bacillus anthraxoides* - 96; 12) *Bacillus anthraxoides* -1; 13) *Pseudomonas aeruginosa*; 14) *Candida albicans*; 15) *Aspergillus niger*.

Результаты проведенных микробиологических исследований (таблица 5) показали, что кизила листьев экстракт жидкий в нативном виде, а также в разведениях (до 1:10) обладает высокой антимикробной активностью в отношении кокковой флоры, энтеробактерий и спорообразующих бактерий, грибов. При этом антимикробное действие изучаемого вещества зависит от концентрации: чем выше концентрация, тем выше антимикробная активность в отношении изучаемых микроорганизмов. Необходимо отметить, что кизила экстракт жидкий сильнее угнетает рост *Escherichia paracoli*, *Staphylococcaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*. Сравнение антимикробной активности кизила экстракта жидкого и зверобоя настойки показало, что кизила экстракт жидкий обладает более выраженной антимикробной активностью, чем настойка зверобоя (в 1,2-4,7 раза).

Выводы. Выявлена антимикробная активность экстракта листьев кизила мужского в отношении энтеробактерий, бактерий рода *Staphylococcaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*. Проведено сравнение антимикробной активности кизила листьев экстракта жидкого и настойки зверобоя и установлено, что кизила листьев экстракт обладает более выраженной антимикробной активностью, чем настойка зверобоя. Он может быть использован для лечения инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта. Выявлено наличие мягкого диуретического эффекта у экстракта из листьев кизила в дозе 5 мл на 1 кг веса, что сопоставимо с действием леспефрила в той же дозе. Комплекс БАВ кизила экстракта, при пероральном введении, относится к малоопасным веществам или веществам 4 класса токсичности и является безопасным для человека.

Список литературы

1. ГОСТ 12.1.007-76 Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. - М., 1976. - 5 с.
2. Государственная фармакопея. – 12-е изд. - М., 2007. - Ч. 1. - 312 с.
3. Кулешова С.А., Ляшенко С.С., Денисенко О.Н. Изучение острой токсичности и местнораздражающего действия масла семян бурачника лекарственного *Borago officinalis* L. // Токсикологический вестник. - 2010. - № 5 (104). - С. 56-57.
4. Кьосев П.А. Полный справочник лекарственных растений. - М. : ЭКСМО-Пресс, 2000. - 992 с.
5. Разработка технологии и анализ экстракта листьев кизила жидкого / Т.А. Шаталова, А.Ю. Айрапетова, Л.А. Мичник [и др.] // Известия Самарского научного центра РАН. - 2012. - Т. 14, № 5 (3). - С. 765-767.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. - М. : Медицина, 2005. - 832 с.
7. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. - М. : Медицина, 2000. - С. 102.

Рецензенты:

Доркина Е.Г., доктор биологических наук, доцент, заведующая кафедрой биохимии и микробиологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Пятигорск.

Василенко Ю.К., доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биохимии и микробиологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Пятигорск.