

Противовоспалительные и антибактериальные свойства извлечений из надземной части живокости высокой *Delphinium elatum* L. (*Ranunculaceae*)

Поветьева Т.Н.¹, Нестерова Ю.В.¹, Крапивин А.В.¹, Суслов Н.И.¹, Лаврентьева Л.В.², Кравцова С.С.², Назорняк Ю.Г.³

Antiinflammatory and antibacteriological properties of extracts from aboveground part of *Delphinium elatum* L. (*Ranunculaceae*)

Povetiyeva T.N., Nesterova Yu.V., Krapivin A.V., Suslov N.I., Lavrentiyeva L.V., Kravtsova S.S., Nagornyak Yu.G.

¹ НИИ фармакологии СО РАМН, г. Томск

² Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск

³ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Поветьева Т.Н., Нестерова Ю.В., Крапивин А.В. и др.

Представлены результаты экспериментальных исследований, подтверждающие наличие у вытяжек, полученных из надземной части живокости высокой (*Delphinium elatum* L.), умеренной антипролиферативной активности, существенного снижения развития иммунного воспаления, вызванного адъювантом Фрейнда. Показано торможение роста микроорганизмов.

Ключевые слова: живокость высокая, воспаление, боль.

The results of experimental researches showed that extracts from *Delphinium elatum* L. have moderate antiproliferative activity, essentially decrease progress of inflammation, induced by Freund's Adjuvant and development of germs.

Key words: *Delphinium elatum*, inflammation, ache.

УДК 615.322:582.675.1:[615.276+615.281.9]

Введение

В последнее время во всем мире отмечается повышенный интерес практической медицины к лекарственным препаратам, получаемым из растительного сырья. Среди природных фармакологически активных веществ алкалоиды являются основной группой, из которой современная медицина черпает наибольшее количество высокоэффективных лекарственных средств. Живокость высокая (*Delphinium elatum* L.) является малоизученным растением. Все его части содержат дитерпеновые алкалоиды, среди которых доминирующим является элатин [6]. В официальной медицине препараты живокости применяются для лечения заболеваний центральной нервной системы [5]. Народная ме-

дицина издавна использовала живокость высокую для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, в качестве ранозаживляющего, обезболивающего и противовоспалительного средства [2, 4].

Цель исследования — изучение противовоспалительных и антибактериальных свойств извлечений из надземной части живокости высокой.

Материал и методы

Исследование активности проведено согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [10]. Надземная часть живокости высокой была собрана в окрестностях г. Томска в фазу цветения. Влаж-

ность высушенного сырья определяли по методике Государственной фармакопеи (1989).

В работе использованы белые аутбредные крысы обоюбого пола ($n = 61$) с исходной массой тела 180—250 г. Животные 1-й категории качества, получены из питомника и клиники лабораторных животных НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск) (сертификат имеется). Их содержание осуществляли в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей (г. Страсбург, 1986). До начала эксперимента животные проходили адаптацию в течение 7 сут в боксе. После клинического осмотра их идентифицировали и рандомизировали.

Настойку растения готовили методом мацерации (настаивания), используя в качестве экстрагента 40%-й этанол. Жидкий экстракт был получен методом перколяции по Н.Д. Чулкову в батарее из пяти перколяторов. Данный метод широко используется при промышленном получении экстрактов [7]. Выделение суммы алкалоидов из надземной части живокости высокой проводили хлороформом после предварительной обработки сырья 5%-м раствором натрия гидроксида и настаивания в течение 12 ч. Подсушенные безводным сульфатом натрия извлечения сгущали на роторном испарителе. Затем сумму алкалоидов подвергали очистке путем перевода оснований алкалоидов в соли хлористоводородной кислоты и, наоборот, с последующей экстракцией их подходящими растворителями. Сухой остаток составил в настойке 9,6%, в экстракте — 11,4%. Выход суммы алкалоидов из надземной части живокости высокой составил 0,23% в пересчете на воздушно-сухое сырье.

Изучение влияния вытяжек из живокости высокой на течение пролиферативной фазы воспаления проводили на модели ватной гранулемы. Стерильный ватный тампон (массой 13 мг) имплантировали крысам под кожу спины между лопатками. Настойку растения в дозах 0,25; 0,5 мл/кг массы тела, экстракт в дозах 0,12; 0,25 мл/кг массы тела и сумму алкалоидов в дозе 0,05 мл/кг массы тела, а также препарат сравнения индометацин в дозе 6 мг/кг массы тела вводили через зонд в желудок ежедневно (со дня имплантации) в течение 5 сут, контрольные животные получали в эквивалентной дозе растворитель. На 6-е сут гранулемы извлекали и взвешивали. Затем высушивали их до по-

стоянной массы при 60 °С и снова взвешивали. Пролиферативную реакцию оценивали по разнице между массой высушенной гранулемы и исходной массой ватных тампонов. Экссудативный эффект оценивали по разнице между массой сырой и сухой гранулемы.

Иммунное воспаление вызывали у животных субплантарным введением в левую заднюю лапу 0,1 мл полного адьюванта Фрейнда. Воспалительную реакцию оценивали в динамике онкометрически. Первичную реакцию развития артрита (отек на левой лапе) фиксировали в течение 13 сут после инъекции адьюванта. Вторичную иммунологическую реакцию (отек на правой лапе) оценивали на 14-е сут после введения флоггена. Изучаемые извлечения живокости высокой: настойку в дозе 0,5 мл/кг массы тела, экстракт в дозе 0,12 мл/кг массы тела и сумму алкалоидов в дозе 0,05 мл/кг массы тела вводили в течение 14 сут, начиная за сутки до инъекции адьюванта. В качестве препарата сравнения использовали диклофенак натрия (диклонат П) в дозе 10 мг/кг массы тела.

При изучении антимикробной активности использовали метод перпендикулярных штрихов [9] и метод аппликации растительных препаратов на газон микробной культуры [8]. В качестве тест-объектов были использованы коллекционные штаммы *Escherichia coli* (ATCC25922) и *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), полученные из ГИСК им. Л.А. Тарасевича (г. Москва). Антибактериальные свойства оценивали по размеру зоны угнетения роста микроорганизмов.

Полученные результаты обрабатывали статистическим методом. Проводились описательный и сравнительный анализы количественных переменных. Проверку на нормальность распределения осуществляли при помощи W -критерия Шапиро—Уилки. Данные представлены в виде среднего арифметического M и ошибки среднего m . При нормальном распределении независимых переменных проверку гипотезы о равенстве выборочных средних выполняли с использованием t -критерия Стьюдента. В случае отсутствия нормального распределения для оценки различий между выборками применяли непараметрический U -критерий Манна—Уитни. При уровне значимости $p < 0,05$ выявленные различия считались статистически значимыми [3].

Результаты

Исследование острой токсичности водно-спиртовых вытяжек из надземной части живокости показало, что

ЛД₅₀ настойки и экстракта была на уровне 40%-го этанола и составила 24,5 мл/кг массы тела.

При изучении антипролиферативных свойств установлено, что введение экстракта в дозе 0,25 мл/кг массы тела приводило к достоверному снижению воспалительного разрастания грануляционной ткани на 19% по сравнению с контрольными значениями (табл. 1). Под действием других растительных средств отмечали тенденцию к угнетению пролиферации. При этом статистически значимых результатов не выявлено. Введение настойки в дозе 0,5 мл/кг массы тела, экстракта в дозе 0,12 мл/кг массы тела и суммы алкалоидов в дозе 0,05 мл/кг массы тела оказало наибольшую эффективность на экссудативную фазу хронического воспаления, снижая массу экссудата в 1,4; 1,5 и 1,7 раза соответственно относительно контроля. Препарат сравнения индометацин угнетал образование грануляционной ткани на 8,9% и уменьшал в 1,9 раза массу экссудата в очаге хронического воспаления.

Сравнение противовоспалительной активности извлечений из живокости высокой проводили также на модели адьювантного артрита, которая считается одной из наиболее адекватных моделей хронического иммунного воспаления [11]. Проведенные исследования показали, что прирост объема воспаленной конечности крыс был зафиксирован у животных контрольной группы уже через 3 ч после введения адьюванта. Через сутки после инокуляции адьюванта воспалительная реакция достигала максимальной выраженности,

что характеризовалось значительным отеком большой конечности, выраженной гиперемией. У животных контрольной группы на протяжении всего опыта отек лапы был максимально выражен. Введение диклофенака натрия, использованного в качестве препарата сравнения, во все сроки наблюдения уменьшало отечность конечностей животных в 1,4—1,9 раза относительно контрольных значений (табл. 2).

Установлено, что через сутки после введения адьюванта под действием настойки и экстракта растения происходило снижение экссудативной реакции в очаге воспаления в 1,9 и 2,3 раза соответственно относительно контроля. Индуцированный отек лапы животных на 7-е сут опыта при введении настойки уменьшался в 4 раза, при введении экстракта — в 15 раз. Введение суммы алкалоидов также способствовало достоверному угнетению отека на 7-е сут опыта в 4 раза относительно контроля. Начиная с 12-х сут после инъекции адьюванта наблюдали регресс симптомов артрита. Изучаемые фитопрепараты живокости ускоряли процессы восстановления тканей воспаленной конечности.

Вторичную иммунологическую реакцию (отек на правой неинъецированной лапе) оценивали на 14-е сут после введения адьюванта Фрейнда. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что настойка и сумма алкалоидов угнетали прирост объема неинъецированной конечности у крыс, достоверно уменьшая его в 2,2 и 1,9 раза соответственно относительно контроля.

Таблица 1

Влияние извлечений из надземной части *Delphinium elatum* на развитие ватной гранулемы у беспородных крыс

| Группа | Доза, мг/кг массы тела | Масса сухой грануляционно-фиброзной ткани, мг ($M \pm m$) | Угнетение пролиферации, % | Масса экссудата, мг ($M \pm m$) |
|------------------------------|------------------------|---|---------------------------|-----------------------------------|
| Контроль ($n = 10$) | — | 63,7 ± 5,0 | 0 | 236,5 ± 27,8 |
| Индометацин ($n = 5$) | 6 | 58,0 ± 6,5 | 8,9 | 123,2 ± 9,0* |
| Настойка ($n = 5$) | 0,25 | 61,2 ± 8,6 | 3,9 | 191,4 ± 25,4 |
| | 0,5 | 55,0 ± 9,3 | 13,6 | 165,4 ± 23,8* |
| Экстракт ($n = 5$) | 0,12 | 54,2 ± 6,8 | 14,9 | 158,0 ± 16,8* |
| | 0,25 | 51,6 ± 5,8* | 19,0 | 210,0 ± 27,6 |
| Сумма алкалоидов ($n = 5$) | 0,05 | 54,8 ± 9,2 | 14,0 | 134,6 ± 24,5* |

Примечание. Здесь и в табл. 2: n — количество животных; здесь и в табл. 2—4: * — различия достоверны в сравнении с контролем при $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние извлечений из надземной части *Delphinium elatum* на развитие отека у беспородных крыс, вызванного адьювантом Фрейнда

| Группа | Время после введения адьюванта Фрейнда | | | | | |
|-----------------------|--|--------------------|----------------------------------|--------------------|----------------------------------|--------------------|
| | 1-е сут | | 7-е сут | | 14-е сут | |
| | Прирост конечности ($M \pm m$) | Угнетение отека, % | Прирост конечности ($M \pm m$) | Угнетение отека, % | Прирост конечности ($M \pm m$) | Угнетение отека, % |
| Контроль ($n = 10$) | 44,2 ± 10,3 | 0 | 34,0 ± 8,0 | 0 | 27,3 ± 4,9 | 0 |

| | | | | | | |
|---------------------------|-------------|------|------------|------|-------------|------|
| Диклофенак натрий (n = 6) | 32,0 ± 3,9 | 27,6 | 20,7 ± 0,5 | 39,1 | 14,1 ± 2,5 | 48,4 |
| Настойка (n = 5) | 22,9 ± 5,7* | 48,2 | 8,2 ± 4,9* | 75,9 | 12,2 ± 4,9* | 55,3 |
| Экстракт (n = 5) | 18,9 ± 2,9* | 57,2 | 4,0 ± 3,8* | 88,2 | 14,8 ± 4,9 | 45,8 |
| Сумма алкалоидов (n = 5) | 29,6 ± 4,6 | 33,0 | 8,7 ± 4,1* | 74,4 | 14,7 ± 2,7* | 46,2 |

Диклофенак натрий оказывал менее выраженный эффект, снижая отек неинъецированной лапы крыс в 1,9 раза относительно контрольных значений.

Различные виды микроорганизмов могут быть флоготенными факторами. Инфицированное воспаление — весьма серьезная проблема медицины. Доминирующее положение среди возбудителей гнойно-воспалительных процессов занимает *Staphylococcus aureus* [1].

Оценка антибактериальной активности показала, что отвар надземной части живокости не проявлял достоверного угнетения роста бактерий по сравнению с контрольными показателями. Под влиянием свежих листьев растения наблюдалось подавление роста *Staphylococcus aureus*. Ингибирующего эффекта в отношении *Escherichia coli* не обнаружено (табл. 3).

Таблица 3
Антибактериальные свойства растительных препаратов из надземной части *Delphinium elatum* (M ± m)

| Объект исследования (количество проб в каждой группе 7) | Зона угнетения роста, мм | |
|---|--------------------------|------------------------------|
| | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Контроль (вода) | 0 | 0 |
| Отвар надземной части | 2,3 ± 1,2 | 2,3 ± 1,2 |
| Свежие листья | 0 | 2,5 ± 0,8* |

Таблица 4
Антибактериальные свойства настойки из надземной части *Delphinium elatum* (M ± m)

| Объект исследования (количество проб в каждой группе 7) | Зона угнетения роста, мм | Контроль (40%-й спирт) | |
|---|--------------------------|-------------------------|------------------------------|
| | | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Контроль | | 2,1 ± 0,7 | 7,0 ± 1,3* |
| Настойка надземной части | | 2,3 ± 0,9 | 7,5 ± 1,1* |

В другой серии опытов было исследовано антибактериальное действие настойки живокости на тест-штаммы (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*). Из полученных данных следует, что настойка надземной части растения проявляла выраженную антибактери-

альную активность (табл. 4). Зоны угнетения роста тест-штаммов были в 3,3 раза больше, чем в контроле.

Выводы

1. Извлечения из надземной части живокости высокой обладают умеренными антипролиферативными свойствами.
2. Растительные средства из живокости высокой проявляют выраженный противовоспалительный эффект на модели хронического иммунного воспаления.
3. Свежие листья растения и в большей степени настойка надземной части оказывают угнетающее действие на рост микроорганизмов. Фитопрепараты эффективны в отношении как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий.

Литература

1. *Антимикробные вещества высших растений* / В.Г. Добротько, Б.Е. Айзман, М.О. Швайгер и др. Киев: Изд-во АН Укр. ССР. 1958. 309 с.
2. *Гончарова Т.А.* Энциклопедия лекарственных растений: лечение травами. М.: ИД «МСП», 1999. 560 с.
3. *Гублер Е.В.* Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. М.: Медицина, 1978. 293 с.
4. *Крылов Г.В.* Травы жизни и их искатели. Новосибирск: Новосибирское кн. изд-во, 1972. 280 с.
5. *Минаева В.Г.* Лекарственные растения Сибири. Новосибирск: Наука, 1991. 428 с.
6. *Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П.* Фармакогнозия: учебник. М.: Медицина, 2002. 656 с.
7. *Пономорев В.Д.* Экстрагирование лекарственного сырья. М.: Медицина, 1976. 202 с.
8. *Райс Э.* Аллелопатия. М.: Мир, 1978. 391 с.
9. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии: учеб. пособие / под ред. Н.С. Егорова.* М.: Медицина, 1995. 221 с.
10. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.* М.: Медицина, 2000. 398 с.
11. *Сигидин Я.И., Шварц Г.Я., Арзамасцев А.П., Либерман С.С.* Лекарственная терапия воспалительного процесса. М.: Медицина, 1988. 240 с.

Поступила в редакцию 27.09.2011 г.

Утверждена к печати 05.03.2012 г.

Сведения об авторах

Т.Н. Поветьева — д-р биол. наук, профессор, ведущий науч. сотрудник лаборатории фитотерапии НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск).

Ю.В. Нестерова — канд. мед. наук, науч. сотрудник лаборатории фитотерапии НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск).

А.В. Крапивин — аспирант лаборатории фитотерапии НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск).

Н.И. Сулов — д-р мед. наук, профессор, зав. лабораторией фитотерапии НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск).

Л.В. Лаврентьева — канд. биол. наук, доцент кафедры микробиологии НИ ТГУ (г. Томск).

Поветьева Т.Н., Нестерова Ю.В., Крапивин А.В. и др. Противовоспалительные и антибактериальные свойства извлечений...

С.С. Кравцова — канд. хим. наук, доцент кафедры органической химии НИ ТГУ (г. Томск).

Ю.Г. Нагорняк — канд. биол. наук, ассистент кафедры гигиены СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Поветьева Татьяна Николаевна, тел. 8-909-540-0091; e-mail ptn@bk.ru