МИКРОБИОЛОГИЯ

А.В.Фролова, А.Н.Косинец, Г.Н.Бузук

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Витебский государственный
медицинский университет

Проведен сравнительный анализ антимикробной активности водных и спиртовых извлечений лекарственных растений, таких как зверобой продырявленный, календула лекарственная, маклейя мелкоплодная, чистотел большой, ольха серая. Установлено, что выраженный антимикробный эффект в отношении изученной грамположительной микрофлоры проявляет настой травы маклейи мелкоплодной, в отношении грамотрицательной – отвар соплодий ольхи серой. Прослежена зависимость антимикробной активности маклейи от количественного содержания алкалоидов в сырье. С целью дальнейшей разработки лекарственных средств растительного происхождения в качестве перспективного источника выбраны листья маклейи мелкоплодной.

ВВЕДЕНИЕ

Для решения проблемы хирургической инфекции предложен широкий арсенал отдельных лекарственных средств и их сочетаний, методов и систем [1]. Если XX век ознаменовался в медицине изобилием синтетических лекарственных средств, то в нынешнем столетии отмечается повышенный интерес к лекарственным средствам растительного происхождения.

Из растительных средств, применяемых для лечения хирургических инфекций, фитопрепараты с противовоспалительным действием составляют 34%; антимикробным – 21%, фунгицидным – 2%, усиливающим регенерацию – 16%, обезболивающим – 11% [2].

Наиболее часто при производстве фитопрепаратов используются растения семейств Бобовых, Миртовых, Сложноцветных, Губоцветных (по 12%). Второе место (7%) отведено представителям семейств Пасленовых, Маковых, Сосновых, незначительная часть (в пределах 2-3%) – семействам Гречишных, Синюховых, Сумаховых [3–8].

Лечебные свойства растений обусловливают их действующие вещества, на основе которых или путем синтеза которых фармацевтическая промышленность выпускает эффективные лекарственные средства.

Лидирующее положение в качестве сырьевых источников занимают растения, богатые эфирными маслами (33%), алкалоидсодержащие – 18%, флавоноидсодержащие – 13%, кумарины, смолы, каротиноиды, сапонины – по 6-7%, незначительно используются полисахаридсодержащие растения [9–11].

В течение последних 40 лет большое внимание уделяется изучению алкалоидов растений родов *Macleaya*, *Chelidonium*, *Papaver*, *Glaucium*, *Argemone*, *Rhoemeri*a, *Eschscholtzia* сем. *Papaveraceae*. При изучении химического состава подземных органов *Macleaya microcarpa*, *Papaver paucifoliatum*, *Papaver bracteatum*, травы и корней *Glaucium flavum var fulvum* было выделено и охарактеризовано около 60 алкалоидов из 9 групп производных изохинолина. При этом наиболее перспективными лекарственными средствами растительного происхождения с антимикробным, антифунгальным и противовоспалительным действием попрежнему признаны хелидонин, хелеритрин, сангвинарин [12]. Высокое содержание двух последних и возможность получения значительной сырьевой массы при выращивании на Кавказе позволили ввести новый вид сырья – надземные органы маклейи для производства препарата «Сангвиритрин» [13].

Разработанный в 70-80-е годы XX века сотрудниками Всесоюзного института лекарственных растений (ВИЛР) антимикробный препарат «Сангвиритрин» представляет собой сумму бисульфатов бензо[с] фенантридиновых алкалоидов сангвинарина и хелеритрина. Сырьем для его промышленного получения служила трава культивируемых в южных регионах Рос-

сии восточно-азиатских видов сем. *Papaveraceae Juss*. – маклейи сердцевидной (*Macleaya cordata (Willd.) R. Br*.) и маклейи мелкоплодной (*Macleaya microcarpa (Maxim.) Fedde*) (ФС-42-2666-89 РФ).

На сегодняшний день Московский производственно-экспериментальный завод Научно-производственное объединение Всероссийских институт лекарственных и ароматических растений (НПО ВИЛАР) является единственным производителем «Сангвиритрина» на всем постсоветском пространстве.

Этот препарат на протяжении десятилетий подтвердил свою высокую эффективность в хирургической практике, и в настоящее время широко применяется в Российской Федерации для лечения заболеваний бактериального и грибкового генеза [14–16].

Однако существует и ряд трудностей, в том числе технического порядка, которые обусловливают поиск альтернативы препарату «Сангвиритрин». К тому же технология производства лекарственного средства трудоемка, энергоемка и предполагает использование токсичных экстрагентов и дорогостоящего оборудования.

В Республике Беларусь этот препарат не зарегистрирован и с начала 90-х годов отсутствует в аптечной сети. Существуют и другие эффективные лекарственные средства, которые не поступают на фармацевтический рынок нашей страны, но с успехом используются в хирургической практике соседних государств. Примером могут служить «Иманин», «Новоиманин».

Создать новые эффективные и при этом относительно дешевые лекарственные средства, не прибегая к дорогостоящим оборудованию и технологиям, возможно, используя перспективные растительные источники.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение антимикробной активности лекарственных растений, для выявления наиболее перспективных из них для разработки новых лекарственных средств для лечения гнойных ран.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для сравнительного анализа нами выбраны трава маклейи мелкоплодной, трава чистотела большого, трава зверобоя продырявленного, соцветия календулы лекарственной, соплодия ольхи серой.

Выбор образцов был обусловлен следующим. Трава зверобоя продырявленного является официнальным сырьем для получения настойки зверобоя 1:5 на 40% спирте, препаратов «Иманин», «Новоиманин» для наружного применения в хирургии. Соцветия календулы лекарственной являются официнальным сырьем для получения настойки 1:10 на 70% спирте и 15% мази календулы для лечения инфицированных ран. Соплодия ольхи серой – официнальное сырье для получения лекарственных средств, в том числе репаратора раневых процессов – «Альтан». Трава культивируемой маклейи мелкоплодной является официнальным сырьем лишь в Российской Федерации для получения антимикробного препарата «Сангвиритрин». С этой же целью, по мнению некоторых авторов, может использоваться официнальное сырье – трава дикорастущего чистотела большого [17].

Для исследования взяты официнальные настойки зверобоя продырявленного и календулы лекарственной и приготовленные в лабораторных условиях настои травы зверобоя продырявленного, соцветий календулы лекарственной, травы маклейи мелкоплодной, травы чистотела большого, отвар соплодий ольхи серой.

В качестве контролей взяты спирт этиловый – компонент настоек, раствор сангвиритрина (основное действующее вещество маклейи и чистотела), стерильный физиологический раствор (на нем готовились настои зверобоя продырявленного, календулы лекарственной, маклейи мелкоплодной, чистотела большого и отвар ольхи серой).

Для приготовления настоя 3 г сырья помещали в плоскодонную колбу, заливали 100 мл стерильного физиоло-гического раствора, закрывали пробкой и нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Затем охлаждали в течение 45 мин., процеживали и оставшуюся массу отжи-

мали. Полученный настой доводили стерильным физиоло-гическим раствором до первоначального объема.

При приготовлении отвара 3 г измельченных соплодий ольхи серой помещали в плоскодонную колбу, заливали 100 мл стерильного физиологического раствора, закрывали пробкой и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем охлаждали в течение 10 мин., процеживали и оставшуюся массу отжимали. Полученный отвар доводили стерильным физиологическим раствором до первоначального объема.

In vitro метод стекающей капли (1) применен для выявления наличия антимикробной активности образцов; для определения степени ее выраженности использован метод диффузии в агар (2) [18].

1) На чашку Петри с мясопептонным агаром (МПА) вносили взвесь 10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ) суточной культуры музейных штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtillis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 026, *P. aeruginosa* ATCC 27853, клинических изолятов *P. vulgaris*.

После подсыхания чашек Петри с микробной взвесью в термостате при 37°С в течение 30 мин на их поверхность наносили стерильной пипеткой 0,1 мл испытуемых образцов. Контролем служили чашки Петри с высеянной тождественной культурой микроорганизмов, в которые соответственно вносили 0,1 мл физиологического раствора, а в случае с настойками – спирта этилового. Контрольные и опытные чашки помещали в термостат (t=37°С) под углом 75° и через сутки проводили учет антимикробной активности в отношении возбудителей (по ширине «дорожки» от стекающей капли).

2) Активность образцов определяли в отношении музейных штаммов *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtillis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 026, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и штаммов, изолированных из патологического материала пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями, находящихся на лечении в Республиканском научно-практическом центре «Инфекция в хирургии» и отделении оториноларингологии Витебской областной клинической больницы.

На чашку Петри с мясопептонным агаром (МПА) вносили взвесь 10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ) суточной культуры исследуемого штамма микроорганизма. Настой (настойку, отвар) испытуемого образца, спирт этиловый и стельный физиологический раствор (контроль) в объеме 20 мкл вносили в лунки, и после суточной инкубации в термостате при t=37°С измеряли зоны задержки роста микроорганизмов. При отсутствии зоны задержки роста считали, что антимикробная активность отсутствует.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как показали наши исследования, антимикробный эффект присущ спиртовым настойкам зверобоя продырявленного и календулы лекарственной, настою травы маклейи мелкоплодной, настою травы чистотела большого, отвару соплодий ольхи серой.

Для настоек зверобоя продырявленного и календулы лекарственной ширина дорожки от стекающей капли, выражающая зону ингибирования роста *S. aureus*, равна 10,2±0,2 мм и 9,9±0,2 мм, *B. subtillis* – 10,0±0,6 мм и 10,0±0,1 мм, *E. coli* – 3,3±0,3 мм и 2,9±0,1 мм, *P. aeruginosa* – 4,1±0,11 мм и 4,0±0,6 мм соответственно.

В отношении *P. vulgaris* эффект отсутствовал у всех испытуемых образцов.

Настои зверобоя продырявленного и календулы лекарственной в отличие от их спиртовых настоек, были достоверно слабее эффективными в отношении возбудителей, что позволяет сделать вывод об антимикробной активности их компонента – спирта этилового ($p<0,01$).

Для настоя травы маклейи мелкоплодной ширина дорожки от стекающей капли в отношении *S. aureus* равна 11,5±0,5 мм, *B. subtillis* – 11,6±0,26 мм, *E. coli* – 5,8±0,13 мм, *P. aeruginosa* – 5,4±0,16 мм, *P. vulgaris* – 0,75±0,13 мм.

Несколько слабее оказался настой травы чистотела большого. Ширина дорожки от стекающей капли в отношении *S. aureus* равна 10,0±0,2 мм, *B. subtillis* – 10,3±0,11 мм, *E. coli* – 4,6±0,1 мм, *P.*

aeruginosa – 3,0±0,16 мм, *P. vulgaris* – 0,22±0,4 мм.

При определении выраженности активности образцов методом диффузии в агар установлено, что достоверно максимальный антимикробный эффект в отношении исследуемой как грамположительной, так и грамотрицательной микрофлоры присущ раствору сангвиритрина ($p<0,001$). При этом размер зоны задержки роста *S. aureus* составил 23,9±0,11 мм, *B. subtilis* – 24,4±0,31 мм, *E. coli* – 14,9±0,23 мм, *P. aeruginosa* – 8,6±0,17 мм, для *P. mirabilis* – 2,7±0,15 мм, *P. vulgaris* – 3,8±0,26 мм.

Настой травы маклейи мелкоплодной обладает антимикробным эффектом в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры, при этом эффект в отношении грамположительной микрофлоры более выражен ($p<0,05$). Размеры зоны подавления роста составили: *S. aureus* 19,8±0,07 мм, *B. subtilis* – 20,2±0,15 мм, *E. coli* – 12,6±0,21 мм, *P. aeruginosa* – 6,9±0,16 мм, для *P. vulgaris* – 0,88±0,17 мм.

Настой травы чистотела большого в отношении грамположительной и граморицательной микрофлоры проявил антимикробный эффект, достоверно слабее выраженный, чем у настоя травы маклейи мелкоплодной ($p<0,001$). Размер зоны подавления роста *S. aureus* составил 16,5±0,09 мм, *B. subtilis* – 17±0,28 мм, *E. coli* – 9,5±0,25 мм, *P. aeruginosa* – 4,4±0,15 мм, *P. vulgaris* – 0,4±0,12 мм.

Настойка календулы лекарственной в отношении грамположительной микрофлоры проявляла достоверно более выраженный антимикробный эффект, чем в отношении грамотрицательных микроорганизмов ($p<0,001$). Размер зоны подавления роста *S. aureus* составил 17,5±0,15 мм, для *B. subtilis* – 18±0,24 мм, *E. coli* – 3,4±0,44 мм, *P. aeruginosa* – 2,1±0,29 мм, *P. vulgaris* – 0,2±0,14 мм.

Настой календулы лекарственной проявил слабый антимикробный эффект в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры. Размер зоны подавления составил для *S. aureus* 3,8±0,1 мм, для *B. subtilis* – 3,9±0,4 мм, *E. coli* – 0,2±0,1 мм, *P. aeruginosa* – 0 мм, *P. vulgaris* – 0 мм.

Настойка зверобоя продырявленного достоверно не отличалась по антимикробной активности от настойки календулы лекарственной. Задержка роста *S. aureus* равна 17,9±0,17 мм, для *B. subtilis* – 17,9±0,14 мм, *E. coli* – 3,8±0,53 мм, *P. aeruginosa* – 2,3±0,4 мм, *P. vulgaris* – 0,5±0,12 мм.

Настой зверобоя продырявленного проявил слабый антимикробный эффект в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры. Размер зоны задержки роста *S. aureus* составил 7,7±0,06 мм, для *B. subtilis* – 7,9±0,07 мм, *E. coli* – 0,2±0,12 мм, *P. aeruginosa* – 0 мм, *P. vulgaris* – 0 мм.

Наибольшим антимикробным эффектом в отношении изученной грамотрицательной микрофлоры обладал отвар соцветий ольхи серой. Размер зоны подавления *E. coli* составил 18,9±0,17 мм, для *P. aeruginosa* – 10,7±0,2 мм, *P. vulgaris* – 5,6±0,38 мм. Однако в отношении изученной грамположительной микрофлоры отвар проявил эффект слабее, чем раствор сангвиритрина и настой травы маклейи мелкоплодной ($p<0,001$). Размер зоны подавления роста составил *S. aureus* 12,4±0,18 мм, *B. subtilis* – 14,4±0,25 мм.

Сравнительная оценка антимикробного эффекта каждого из образцов в отношении исследуемой грамположительной (на примере *S. aureus*) и грамотрицательной микрофлоры (*E. coli*) приведена на рис. 1–2.

С учетом проведенных ранее микробиологических исследований и установлением превалирующей роли грамположительной микрофлоры в развитии гнойно-воспалительных заболе-ваний и осложнений в хирургии [19], в качестве наиболее перспективного лекарственного растения для лечения хирургической инфекции выбрана маклейя мелкоплодная.

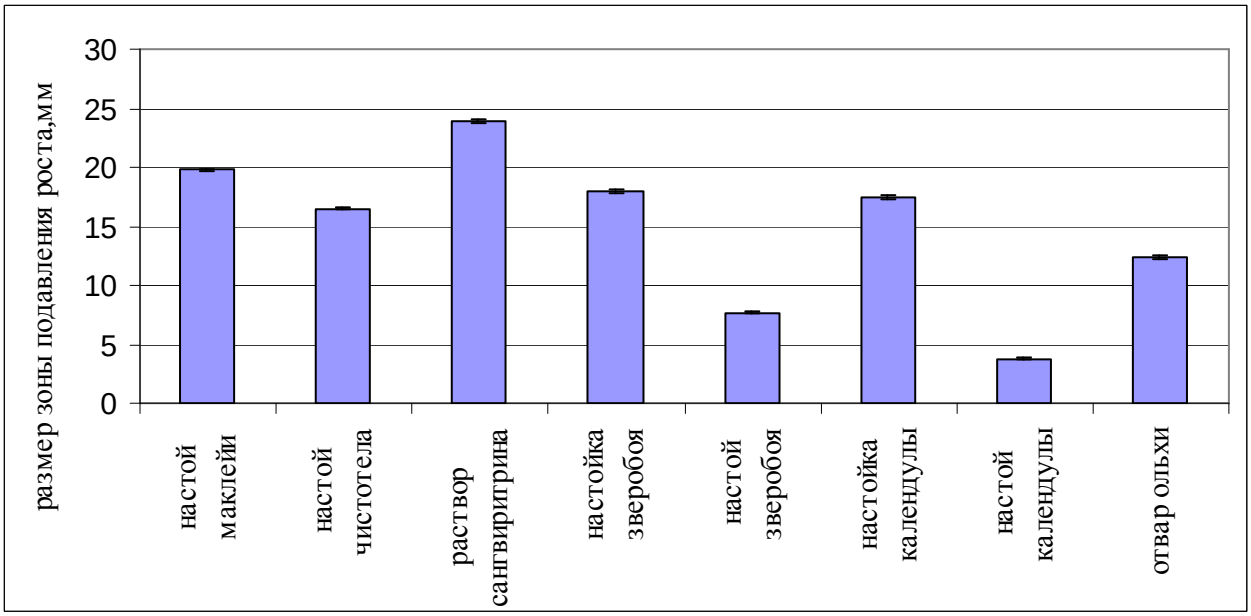

Рис. 1. Размер зоны подавления роста *S. aureus*

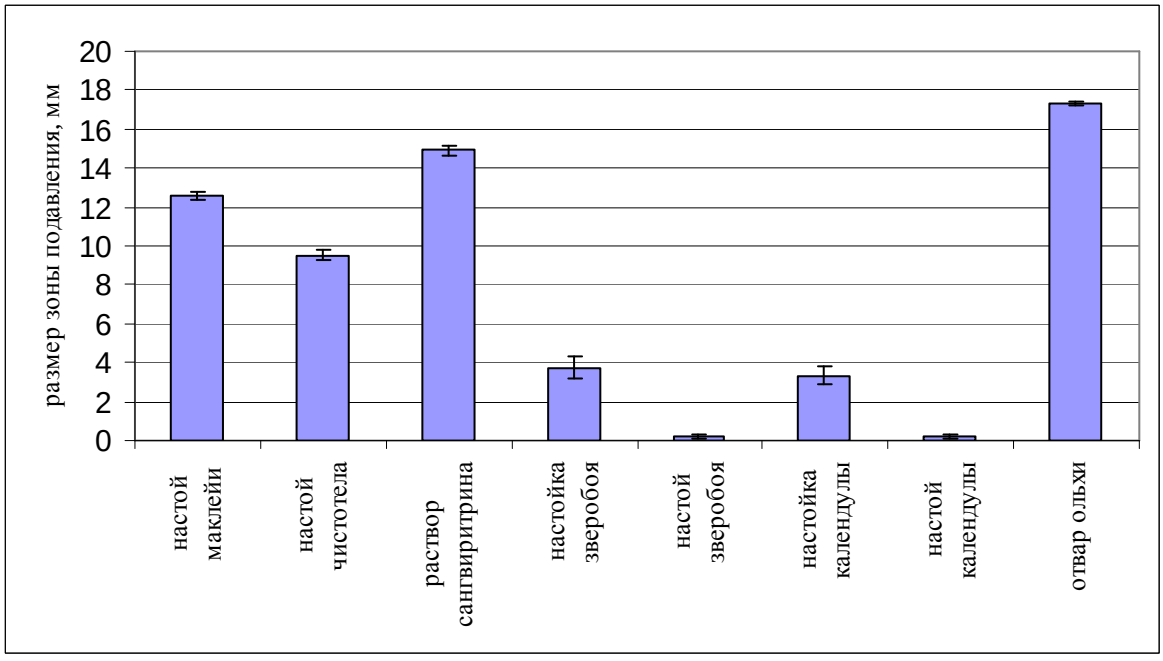

Рис. 2. Размер зоны подавления роста *E. coli*

С целью определения органа (части) растения, обладающего наибольшей антимикробной активностью, проведено сравнительное микробиологическое изучение настоев, приготовленных из цельного листа, листовой пластинки, черешков, травы, стеблей, соцветий. Исследование показало, что настои из цельного листа и листовой пластинки обладают антимикробной активностью, достоверно более выраженной, чем из травы ($p<0,001$) (рис. 3), что хорошо согласуется с данными о содержании алкалоидов в различных частях маклейи мелкоплодной (ри. 4).

Рис. 3. Антимикробная активность настоев из различных органов и частей листа маклейи мелкоплодной в отношении *S. aureus*

Примечание: 1 – цельный лист, 2 – листовая пластинка, 3 – стебли, 4 – соцветия, 5 – черешки, 6 – трава, к – стерильный физиологический раствор

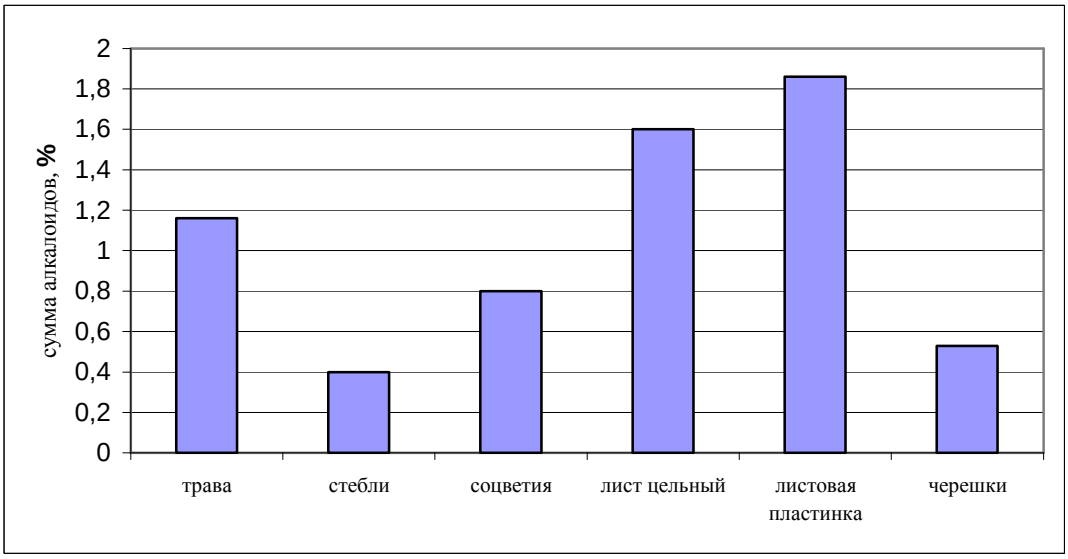

Рис. 4. Содержание алкалоидов в различных органах и частях листа маклейи мелкоплодной

В отношении грамотрицательной микрофлоры антимикробная активность была достоверно ниже, чем в отношении грамположительной. Величины зон подавления роста *E. coli* настоями из листовой пластинки, цельного листа и травы составили 14,7±0,1 мм, 14,5±0,8 мм и 12,6±0,21 мм соответственно, $p<0,001$. Черешки, стебли, соцветия не проявляли антимикробной активности в отношении грамотрицательной микрофлоры (рис. 5).

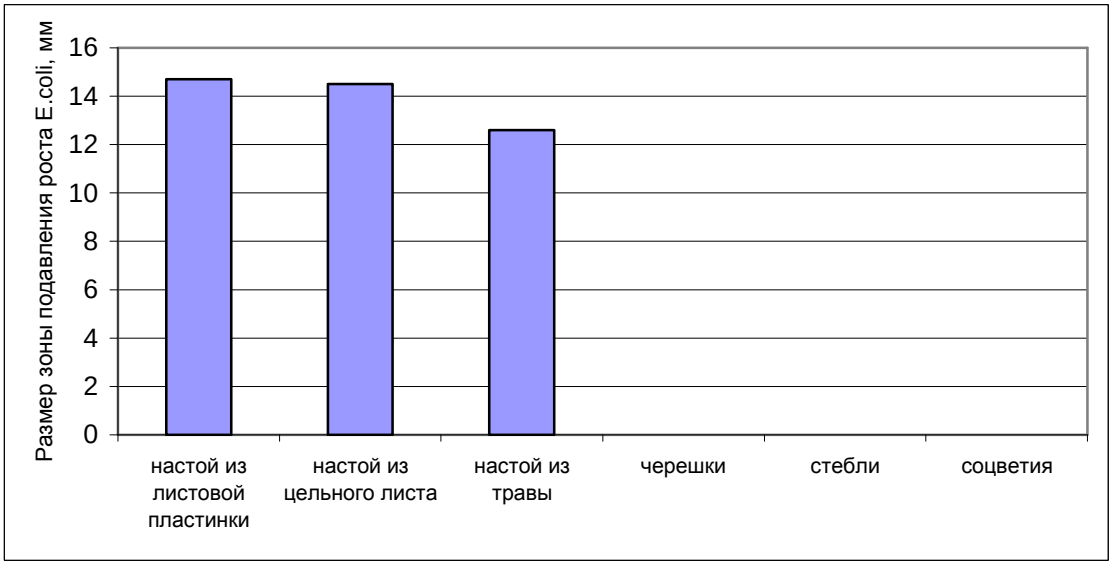

Рис. 5. Размер зоны подавления роста *E. coli* настоями из различных органов и частей листа маклейи мелкоплодной в отношении

ВЫВОДЫ

1) Настойки зверобоя продырявленного, календулы лекарственной, настои травы маклейи мелкоплодной, травы чистотела большого, отвар соплодий ольхи серой проявили антимикробный эффект в отношении возбудителей хирургической инфекции.
2) Отвар соцветий ольхи серой, в отличие от всех остальных образцов, проявил достоверно ($p<0,001$) более выраженный антимикробный эффект в отношении исследованной грамотрицательной микрофлоры.
3) Настой травы маклейи мелкоплодной, в сравнении со всеми растениями, проявил достоверно ($p<0,05$). более выраженный антимикробный эффект в отношении исследованной грамположительной микрофлоры.
4) Наиболее выраженный антимикробный эффект в отношении грамположительной микрофлоры присущ новому виду сырья маклейи мелкоплодной – листьям. Это позволяет считать его наиболее перспективным источником для разработки лекарственных средств с антимикробным эффектом.

SUMMARY

A.V. Frolova, A.N Kosinets, G.N. Buzuk

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HERBS

The comparative analysis of antimicrobial activity of water and ethanol herb's extracts from Hypericum perforatum L., Calendula officinalis L., Macleayae microcarpa (Maxim.) Fedole, Chelidonium majus L., Alnus incana L. Moench is lead. It is established, that the expressed antimicrobic effect concerning grampositive microflorae shows infusum Macleayae microcarpae, concerning gramnegative – decoctum Alnus incana. Dependence of antimicrobic activity on the quantitative maintenance alkaloids in raw material is experimentally established. With the purpose of the further development of medicinal drugs of a phytogenesis as a perspective source leaves Macleayae microcarpae are chosen.

ЛИТЕРАТУРА

1. Даценко, Б.М. Теория и тактика местного лечения гнойных ран / Б.М. Даценко. – Киев, Здоровья, 1995.– 380 с.
2. Кабишев, К.Э. Фитопрепараты в отечественной дерматологической практике / К.Э. Кабишев // Вестник ВГУ. – 2005. – № 1. – С. 189–204.
3. Бальхаев, М.И. Экстракт какалии копьевидной – перспективное ранозаживляющее средство / М.И. Бальхаев, П.Б. Лубсандоржиева, Д.Н. Оленни-

ков // Человек и лекарство: тез. докл. Рос. нац. конгр., Москва, 2-6 апреля 2001 г.: М., 2001.– С. 545-547.
4. Бубенчикова, В.Н. Антимикробная активность некоторых представителей флоры Центрального Черноземья / В.Н. Бубенчикова, И.Л. Дроздова, М.В. Покровский // Человек и лекарство: тез. докл. Рос. нац. конгр., Москва, 2-6 апреля 2001 г. – М. – 2001.– С. 550.
5. Гриневич, М.А. Информационный поиск перспективных лекарственных растений / М.А.Гриневич. – Л.: Наука, 1990. – 138 с.
6. Чейшвили, А.М. Лечение гнойных долго незаживающих ран и язв препаратами дальневосточной пихты: автореф. дис. …канд. мед. наук: 14.00.27 / А.М. Чейшвили; Сиб. мед. акад. – Владивосток, 1996.– 25 с.
7. Al-Gaby, Ali M. Chemical analysis, antimicrobial activity, and the essential oils from some wild herbs in Egypt / Al-Gaby, Ali M. et al. // J. Herbs, Spices and Med. Plants.– 2006.– 7, N 1.– P. 15-23.
8. Groppo, F.C. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms / F.C. Groppo // Int. Dent. J. – 2005. – Dec. 52 (6).– P. 433–437.
9. Лазарева, Е.Б. Местное применение пектинов для лечения ожоговых ран / Е.Б. Лазарева, Т.Г. Спиридонова // Актуальные проблемы термической травмы: материалы Междунар. конф., Москва, 22 июля 2002 г. /Всерос. ожоговый центр; редкол.: Петров В.В. [и др.]. – М., 2002. – С. 280–282.
10. Пашинский, В.Г. Пути рационального исследования лекарственных растительных средств (фармакологические подходы) / В.Г. Пашинский, Т.Н. Поветьева, Л.В. Ратахина // Человек и лекарство: тез. докл. Рос. нац. конгр., Москва, 8-12 апреля 2005 г. – М., 2005.– С. 99.
11. Результаты и перспективы научных исследований в области создания лекарственных средств из растительного сырья / А.И. Шретер [и др.] // Раст. ресурсы.– 1996.– Вып.3, Т. 22.– С. 435-438.
12. Челомбитько, В.А. Изохинолиновые алкалоиды: новые фармакогностические подходы в изучении / В.А. Челомбитько, О.Н. Денисенко, Б.Н. Житарь // Человек и лекарство: тез. докл. Рос. нац. конгр., Москва, 10-14 апреля 2000 г.: М., 2001.– С. 558-559.
13. Некоторые итоги изучения дикорастущих и культивируемых растений семейств Papaveraceae, Fumariaceae и Asteraceae на Северном Кавказе / Челомбитько, В.А. [и др.]; Человек и лекарство: тез. докл. Рос. нац. конгр., Москва, 2-6 апреля 2001 г.: М., 2001.– С. 556.
14. Сангвиритрин / Е.А. Абизов и [и др.] // Медицинская помощь. – 2003. – № 4. – С. 41–46.
15. Быков, В.А. Биомедицинские технологии / В.А.Быков, Ю.И.Денисов-Никольский, Л.Б. Ребров // Биомедицинские технологии / Всерос. научно-исследовательский центр – М., 1998. – Вып. 10. – С. 62–65.
16. Лихачева, Н.П. Современные перевязочные материалы / Н.П.Лихачева, Н.А.Свидзинская // Экспериментальная физиология, гигиена и средства индивидуальной защиты человека: тез. докл. III Всерос. конф. – М., 1999. – С. 224–225.
17. Чистотел большой как сырье для получения лекарственного препарата «Сангвиритрин» / Л.Д. Яхонтова [и др.] // Фармация. – 1973. – №1. – С. 31–33.
18. Красильников, А.П. Справочник по антисептике / А.П. Красильников. – Минск: Вышэйшая школа, 1995.– 366 с.
19. Фролова, А.В. Сравнительная эффективность антимикробного действия антисептиков в отношении возбудителей хирургической инфекции / А.В. Фролова, А.Н. Косинец, В.К. Окулич // Соврем. технологии в хирургии: материалы науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию каф. общей хирургии БГМУ, Минск, 27-28 сент. 2002 г. / Белорус. гос. мед ун-т; редкол. : Г.П. Рычагова [и др.] – Минск, 2002. – С. 236-238.

Поступила 22.12.2006 г.

****