

УДК 615.281.8:615

## ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МАЗИ С ЭКСТРАКТОМ ПОЧЕК ТОПОЛЯ ЧЕРНОГО

**Никитина Н.В., Кулешова С.А.**

*ГБОУ ВПО «Пятигорская ГФА Минздравсоцразвития России»,  
Пятигорск, e-mail: n\_niki7@mail.ru*

Изучена антимикробная активность разработанной дерматологической мази с двухфазным экстрактом почек тополя черного с использованием метода диффузии в агар (способ «колодцев»). В качестве тест-культур использовали одиннадцать различных штамм-культур микроорганизмов. Результаты проведенных микробиологических исследований показали, что двухфазный экстракт почек тополя черного и мазь на его основе обладают выраженным противомикробным действием в отношении патогенных микроорганизмов. Изучена противовоспалительная активность мази с двухфазным экстрактом почек тополя черного в опытах *in vivo*. Установлено, что противовоспалительная активность проявляется как в фазу экссудации, так и в фазу пролиферации хронического пролиферативного воспаления. Полученные результаты обработаны статистически.

**Ключевые слова:** мазь, экстракт почек тополя черного, антимикробная активность, противовоспалительная активность

## THE STUDY OF THE PHARMACOLOGICAL ACTION OF OINTMENT WITH AN EXTRACT OF BLACK POPLAR BUDS

**Nikitina N.V., Kuleshova S.A.**

*Pyatigorsk state pharmaceutical academy, Pyatigorsk, e-mail: n\_niki7@mail.ru*

Studied the antimicrobial activity of dermatological ointments designed with two-phase extract of black poplar buds using the agar diffusion (how «well»). As test cultures used eleven different strain of microorganism cultures. The results of microbiological studies have shown that two-phase extracts of kidney and black poplar ointment based on it have a pronounced antimicrobial action against pathogenic microorganisms. Anti-inflammatory activity was studied with two-phase extract ointment black poplar buds in experiments *in vivo*. It is established that the anti-inflammatory activity is shown as a phase of exudation, and in the proliferation phase of chronic proliferative inflammation. The results are processed statistically.

**Keywords:** ointment, an extract of black poplar buds, the antimicrobial activity of anti-inflammatory activity

Пусковым моментом развития раневого процесса являются повреждение тканей и микробная инвазия. Раневой процесс – сложный комплекс биологических реакций организма, развивающийся в ответ на повреждение тканей и направленный на их заживление. В ходе его имеют место деструктивные и восстановительные изменения тканей, образующих рану и прилегающих к ней – соединительной, эпителиальной, нервной, мышечной.

С позиций общей патологии, таким образом, раневой процесс представляет собой частный случай воспаления, проявляющегося сочетанием местных деструктивно-воспалительных изменений и общих реакций.

По современным данным, течение раневого процесса условно подразделяют на 3 основные фазы: 1-й фаза – фаза воспаления; 2-й фаза – фаза регенерации 3-й фаза – фаза организации рубца и эпителизации.

В зависимости от степени повреждения тканей, отсутствия или наличия микробного загрязнения и некоторым другим причинам, раны заживают по трём основным типам:

– по первичному натяжению без нагноения при слабо выраженных явлениях серозного воспаления;

– по вторичному натяжению, путём гранулирования, при более или менее выраженном гнойном воспалении (так заживают случайные, огнестрельные и колотые раны) – накладывать швы на такие раны недопустимо;

– под струпом, преимущественно у грызунов и птиц, а также при неглубоких ранах у рогатого скота и свиней.

В современной клинической хирургии общепризнанным считается положение, что любая случайная рана является бактериально загрязненной, или первично инфицированной. Под термином «бактериально загрязненная рана» следует понимать такое состояние раны, когда общие и локальные механизмы защиты способны подавить попавшие в рану микроорганизмы и не наблюдается никаких клинических признаков инфекционного процесса в ране.

Принято различать первичное и вторичное микробное загрязнение раны. Первичное загрязнение наступает в момент нанесения раны и характерно для травматических и огнестрельных ран. Вторичное загрязнение раны связано с нарушением правил антисептики во время перевязок и операций и часто является следствием внутренней госпитальной инфекции. Следовательно, само

по себе присутствие микробов в ране (даже патогенных, не говоря уже о группе условно-патогенных микробов) еще не делает развитие инфекции в ране обязательным.

Инфекция в ране развивается при нарушении равновесия между микроорганизмами, загрязняющими рану, и защитными силами макроорганизма, что проявляется клиническими симптомами воспаления. С клинической точки зрения, ведущим фактором, определяющим возможность перехода бактериально-загрязненной раны в инфицированную, является функциональное состояние поврежденных тканей [4, 5].

Воспаление является универсальной реакцией организма на воздействие экзогенных и эндогенных повреждающих факторов, к которым относятся токсины бактерий, вирусов, а также аллергические, физические и химические агенты [6].

Воспалительные реакции могут иметь чрезмерно выраженный характер, что приводит к нарушению функций органов и тканей [6]. В реакции воспаления выделяют фазы альтерации, экссудации и пролиферации. Возможность экспериментального выделения отдельных фаз воспаления широко используется для исследования противовоспалительных средств с целью выявления и отбора новых соединений, а также сравнения эффективности известных классов веществ в эксперименте и клинике.

Разработка лекарственных средств, основой которых служит растительное сырье, является перспективным направлением современного фармацевтического производства. Истинный потенциал лекарственных растений, несмотря на длительный срок их применения в народной и официальной медицине, раскрыт далеко не полностью. По мере исследований новых объектов появляются оригинальные аспекты как в плане применения, так и в технологии фитопрепаратов, использовании новых видов сырья, экстрагентов, путей интенсификации процесса экстракции.

Преимущество фитопрепаратов объясняется, прежде всего, эффективностью, мягким действием и малой токсичностью, что позволяет использовать их длительное время для профилактики и лечения многих заболеваний без риска возникновения побочных явлений. Поэтому фитопрепараты достаточно востребованы, доля их на Российском фармацевтическом рынке значительна, но номенклатура и объем предложения ниже растущей с каждым годом потребности. В наибольшей степени это касается мягких лекарственных форм для наружного применения, используемых для лечения дерматологических заболеваний.

Мази на основе фитокомплексов из лекарственных растений, обладающие антимикробной и противовоспалительной активностью, широко используются в медицинской практике для лечения различных инфекционных гнойно-воспалительных, аллергических и травматических поражений кожи. Перспективным источником получения таких препаратов являются представители семейства ивовых (*Salicaceae*), в частности, виды рода тополь (*Populus L.*), учитывая тот факт, что почки тополя содержат богатый набор биологически активных веществ (БАВ), представляющих собой флавоноиды, фенилпропаноиды, простые фенолы, эфирные масла и др. Широко известны данные об успешном применении спиртовых экстрактов почек тополя.

Традиционно спирто-водные и масляные извлечения из сырья получают раздельно, используя либо масляные, либо спирто-водный экстрагент. При такой технологии экстракция происходит неполно и в отходах производства остается значительное количество биологически активных веществ. Одним из новых методов получения природных комплексов БАВ, является экстракция растительного сырья двухфазной системой экстрагентов. Этот способ позволяет в одной технологической операции извлекать из растительного сырья и липофильные, и гидрофильные соединения, что обеспечивает расширение компонентного состава, большую степень извлечения БАВ и эффективность технологического процесса. Нами была разработана технология получения двухфазного экстракта из почек тополя (*Populus nigra L.*), содержащего состав БАВ, наиболее близкий к природному, с целью создания на его основе мази, обладающей противовоспалительным и антимикробным действием [7, 8, 9].

Актуальность использования фитокомплекса почек тополя черного в мазях доказывается и тем фактом, что при сравнении химического состава почек тополя и прополиса показано, что по составу они близки, но у почек отмечается более высокое содержание биологически активных веществ и, как следствие, более высокая антимикробная активность. Экспериментально установлено, что антимикробная активность почек тополя (различных видов) обусловлена не эфирным маслом, а в основном флавоноидами (пиноцембрин, пиностробин, 2',6'-дигидро-4'-метоксихалкон и др.) и фенилпропаноидами (кофейная, феруловая кислоты, изопентилкофеат и др.) [1, 2].

В связи с этим стандартизацию почек тополя предложено проводить по содержанию суммы флавоноидов и гидроксикорич-

ных кислот в пересчете на пиностробин, так как согласно изучению микробиологической активности, антимикробные свойства экстрактов их почек тополя обусловлены наличием флавоноидов, в частности пиноцембрина и пиностробина, и гидрокоричных кислот [3].

**Целью исследования** явилось изучение антимикробной и противовоспалительной активности мази с двухфазным экстрактом почек *Populus nigra* L.

Нами было изучено противомикробное действие двухфазного экстракта почек тополя черного и мази на его основе. Микробиологическому исследованию были подвергнуты двухфазный экстракт тополевого почек, мазь, а также основа – сплав ПЭО-400 и ПЭО-1500. Определение чувствительности патогенных микроорганизмов к экстракту, к мази и к основе проводили, используя метод диффузии в агар (способ «колодцев»).

Метод основан на оценке угнетения роста тест-микроорганизмов определенными концентрациями испытуемого средства.

Для проверки антимикробного действия использовали 24-часовые тест-культуры, выращенные на скошенном мясептонном агаре (МПА). Микробные культуры с МПА смывали 2–3 мл физиологического раствора и готовили взвесь, содержащую 500 млн микробных тел в 1 мл по стандарту мутности.

На поверхности агара в чашках Петри одинакового диаметра делали посев сплошным газоном стандартных взвесей используемых тест-культур. Для этого толстый слой агара засеивали 1–2 мл взвеси и растирали шпателем для равномерного распределения микробов по всей поверхности чашки Петри. Излишек взвеси полностью удаляли, подсушивали в течение 30 минут. Стерильным сверлом ( $d = 6$  мм) делали 6 лунок («колодцев») на расстоянии 2,5 см от центра и на одинаковом расстоянии друг от друга, лунки через одну заполняли исследуемыми экстрактом, мазью и основой. Под крышку чашки Петри помещали стерильный фильтр во избежание попадания конденсата на лунки. Все чашки Петри ставили в термостат (37°C) на 18–20 часов строго горизонтально для получения круглых зон угнетения роста микрофлоры.

После инкубации проводили оценку результатов по диаметру зон задержки роста тест-культуры микроорганизмов вокруг колодца, включая диаметр самого колодца. Диаметр зон угнетения роста измеряли с помощью миллиметровой бумаги. В некоторых случаях зоны угнетения имели овальную форму. Поэтому в таких случаях измеряли наибольший и наименьший диа-

метры зоны и вычисляли среднюю величину, которая и принималась за показатель.

В качестве тест-культур использовали следующие культуры микроорганизмов:

1. *Staphylococcus aureus* (209).
2. *Staphylococcus aureus* (Type).
3. *Staphylococcus epidermidis* Wood-46.
4. *Escherichia coli* 675.
5. *Escherichia coli* 055.
6. *Salmonella typhimurium*.
7. *Shigella flexneri*.
8. *Shigella sonnei* 3d.
9. *Pseudomonas aeruginosa*.
10. *Bacillus subtilis* L<sub>2</sub>.
11. *Bacillus anthracoides* – 96.

Между степенью чувствительности микроорганизмов к антибактериальному компоненту и размером диаметра зоны угнетения роста культур имеются следующие соотношения:

- Менее 10 мм – нет чувствительности.
- 10 мм – умеренная чувствительность.
- Более 10 мм – высокая чувствительность.

Результаты исследования представлены в табл. 1.

Из представленных данных видно, что двухфазный экстракт почек тополя черного обладает бактериостатическим действием в отношении *Escherichia coli* 055, *Bacillus subtilis* L<sub>2</sub> и выраженной бактерицидной активностью в отношении всех остальных используемых в опыте кокковых культур, бацилл и энтеробактерий.

Установлено, что 20%-я мазь на основе двухфазного экстракта также обладает антибактериальной активностью: в отношении кокковых культур, *Shigella sonnei* 3d, *Bacillus anthracoides*-96 выражено ее бактерицидное действие, в отношении остальных используемых тест-культур – бактериостатическое. Чувствительность используемых тест-культур к основе – сплав ПЭГ-400 – ПЭГ-1500 отсутствует.

В руководстве по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ предложено несколько методических тестов для оценки противовоспалительного эффекта исследуемых веществ [2].

Представляло интерес определить влияние мази с двухфазным экстрактом почек тополя черного на развитие экссудативной фазы воспаления, а также влияние на пролиферативные процессы.

Антипролиферативное и противоотечное свойства мази с двухфазным экстрактом почек тополя оценивали на модели с имплантированными под кожу животных стерильных ватных шариков одинаковой массы (15 мг). Противовоспалительный эффект проявляется в способности изуча-

емых средств уменьшать объем экссудата и образование грануляционной ткани в воспалительном очаге, развивающемся в месте

травмирования кожи. Эксперимент проводили на 18 взрослых белых крысах обоего пола весом 200–230 г.

**Таблица 1**

Результаты изучения антимикробной активности двухфазного экстракта почек тополя и мази на его основе

Используемые тест-культуры	Диаметр зон задержки роста тест-культур, мм		
	Двухфазный экстракт почек тополя черного	20%-я мазь	Основа – сплав ПЭГ-400 –ПЭГ-1500
1	16 б/цид	14 б/цид	6 б/ст
2	15 б/цид	12 б/цид	6 б/ст
3	14 б/цид	12 б/цид	5 б/ст
4	11 б/цид	10 б/ст	6 б/ст
5	13 б/ст	11 б/ст	6 б/ст
6	13 б/цид	11 б/ст	6 б/ст
7	14 б/цид	12 б/ст	7 б/ст
8	15 б/цид	14 б/цид	6 б/ст
9	15 б/цид	13 б/ст	7 б/ст
10	12 б/ст	10 б/ст	5 б/ст
11	14 б/цид	13 б/цид	6 б/ст

У крыс, находящихся под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг внутрибрюшинно), в области спины выстригали шерсть на площади около 6 см<sup>2</sup>. В асептических условиях скальпелем делали разрез кожи и подкожной клетчатки длиной 1 см, пинцетом через разрез формировали полость, в которую помещали предварительно взвешенный стерильный ватный шарик, после этого рану зашивали. Место разреза кожи с первого дня ежедневно обрабатывали исследуемой мазью с двухфазным экстрактом почек тополя. В группе сравнения шов смазывали мазью календулы, выпускаемой отечественной фармацевтической промышленностью. Группа контроля (6 крыс) находилась в условиях самоизлечения. Все время опыта животные находились в равных условиях, на стандартном питании вивария,

воду получали без ограничения. Состояние животных было обычным, нормальным со стороны всех физиологических показателей деятельности систем организма.

На 8-й день шарики, превратившиеся в гранулемы, извлекали в условиях наркоза. Мокрые экспериментальные гранулемы сразу же взвешивали на торсионных весах. С целью характеристики влияния исследуемых объектов на развитие фаз воспалительного процесса шарики-гранулемы высушивали в сушильном шкафу до тех пор, пока их масса не стала изменяться. О величине экссудативной фазы воспаления судили по разнице в массе гранулем до и после высушивания. О величине пролиферативной фазы – по разнице в весе высушенных гранулем и ватных шариков.

Полученные результаты обработаны статистически и представлены в табл. 2.

**Таблица 2**

Результаты изучения антипролиферативного и противоотечного действия разработанной мази

Исследуемый объект	Вес гранулемы, мг		Экссудация, мг	Пролиферация, мг
	до высушивания	после высушивания		
Контроль	270,5 ± 11,04	55,4 ± 2,53	215,1 ± 5,37	40,4 ± 1,81
Мазь календулы	234,5 ± 17,28 <sup>0</sup>	50,5 ± 2,88 <sup>0</sup>	184,0 ± 6,08 <sup>x</sup> –14,5%	35,5 ± 3,02 <sup>0</sup> –12,0%
Мазь с двухфазным экстрактом почек тополя	226,0 ± 9,14 <sup>x</sup>	47,2 ± 2,04 <sup>x</sup>	178,8 ± 4,53 <sup>x</sup> –17,0%	32,2 ± 1,23 <sup>x</sup> –20,3%

**Примечания:**

x – изменения достоверны относительно контроля ( $p < 0,05$ );

0 – изменения недостоверны относительно контроля ( $p > 0,05$ );

% – изменение в % относительно контроля.

Результаты опыта показали, что мазь с двухфазным экстрактом почек тополя достоверно снижает величину отека относительно контроля на 17%.

Результат антиэкссудативной активности мази календулы достоверно меньше контроля на 14,5%. В сравнительном плане не наблюдали достоверных отличий в противоотечном действии мази с двухфазным экстрактом почек тополя черного и препарата – сравнения мази календулы.

Образование грануляционной ткани на фоне исследуемой мази достоверно тормозилось в сравнении с контролем на 20,3%; под влиянием мази календулы снижалось на 12% недостоверно относительно контроля. В сравнительном аспекте в наших исследованиях не было достоверных различий в синтезе фиброзной ткани на фоне мази с двухфазным экстрактом почек тополя черного и мази календулы (на 8,3%).

Установлено в эксперименте, что мазь с двухфазным экстрактом почек тополя обладает противовоспалительной активностью. Причём данный эффект проявляется как в фазу экссудации, так и в фазу пролиферации хронического пролиферативного воспаления.

По сравнению с мазью календулы мазь на основе двухфазного экстракта почек тополя проявляет некоторую тенденцию к уменьшению воспалительного процесса, однако, статистически достоверных различий между группой, получавшей исследуемую мазь и группой, получавшей мазь календулы, не наблюдалось.

### Выводы

Проведенные микробиологические исследования показали, что двухфазный экстракт почек тополя черного и мазь на его основе обладают выраженным противомикробным действием.

Установлено выраженное противовоспалительное действие разработанной мази с двухфазным экстрактом почек тополя черного, сопоставимое с действием мази календулы.

### Список литературы

1. Браславская В.Б., Куркин В.А., Бакилин В.Т. Сравнительное химическое исследование некоторых видов и гибридных форм *Popula L.*, культивируемых в Сибири // Растительные ресурсы. – 1993. – Т. 29, Вып. 4. – С. 77–81.
2. Браславская В.Б., Куркин В.А., Жданов И.П. Антимикробная активность экстрактов и эфирных масел почек некоторых видов *Popula L.* // Растительные ресурсы. – 1991. – Т. 27, Вып. 2. – С. 77–81.
3. Браславская В.Б., Куркин В.А. Стандартизация сырья и препаратов тополя и прополиса // Фармация. – 2009. – №4. – С. 53–56.
4. Ефименко Н.А., Гучев И.А., Сидоренко С.В. Инфекции в хирургии. Фармакотерапия и профилактика / под ред. С.В. Сидоренко. – Смоленск, 2004. – 296 с.
5. Крутиков М.Г. Местное лечение ран и ожогов / М.Г. Крутиков, А.Э. Бобровников. // Ремедиум. – 2006. – №5. – С. 41–45.
6. Макаров В.А., Реккандт С.А. Патология. – Пятигорск, 1998. – 375 с.
7. Никитина Н.В. Изучение условий получения двухфазного экстракта из тополя черного почек (*Populus nigra L.*), семейства *Salicaceae* и его анализ / Н.В. Никитина, С.Н. Степанюк // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: Сб. науч. трудов. – Пятигорск, 2009. – Вып. 64. – С. 198–199.
8. Изучение возможности использования почек тополя черного для антимикробного препарата / Н.В. Никитина, Т.И. Максименко [и др.] // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения: материалы VII Международ. съезда. – СПб., 2003. – С. 80–82.
9. Никитина Н.В., Степанюк С.Н. Разработка дерматологической мази с экстрактом почек *populus nigrum* // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2010. – №16 (87), Вып. II. – С. 120–127.
10. Определение антимикробного действия лекарственных веществ – практические подходы / О.В. Гунар., Н.И. Каламова [и др.] // Фармация. – 2002. – №2. – С. 4–7.

### Рецензенты:

Молчанов Г.И., д.ф.н., профессор кафедры социально-гуманитарных наук Пятигорского филиала ГОУ ВПО Северо-Кавказского ГТУ, г. Пятигорск;

Ефименко Н.В., д.м.н., профессор, зам. директора по науке ФГУ «Пятигорский ГНИИ Курортологии ФМБА России», г. Пятигорск.

Работа поступила в редакцию 28.10.2011.