УДК 615.322: 582.623.2

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ ОСИНЫ СУХОГО

Лобанова И.Ю., Турецкова В.Ф., Зверев Я.Ф., Талалаева О.С.
ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, Барнаул, e-mail: liu86@mail.ru

Проведено исследование острой токсичности и антиоксидантной активности экстракта листьев осины сухого. При энтеральном введении крысам и мышам в дозах от 2500 до 10000 мг/кг острой токсичности не выявлено, гибель животных отсутствовала, что не позволило установить летальную дозу экстракта (LD_{50}). В связи с чем, изучаемый препарат может быть отнесен согласно ГОСТ 12.1.007–76, к IV классу опасности (малоопасные вещества). В экспериментах in vitro установлены высокая антиоксидантная (67,0 ± 1,12 %) и низкая прооксидантная (25,1 ± 1,68 %) активности исследуемого экстракта. Полученные данные свидетельствует о том, что биологически активные вещества экстракта способны подавлять процессы пероксидации, выступая в роли прямого антиоксиданта, и не обладают способностью прямо индуцировать перекисное окисление липидов клеточных мембран.

Ключевые слова: осина обыкновенная, экстракт сухой, острая токсичность, антиоксидантная активность, прооксидантная активность

THE STUDY OF ACUTE TOXICITY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE DRY EXTRACT OF LEAVES OF POPULUS TREMULA L.

Lobanova I.Y., Turetskova V.F., Zverev Y.F., Talalaeva O.S.
Altay State Medical University, Barnaul, e-mail: liu86@mail.ru

The investigation of acute toxicity and antioxidant activity of the dry extract of leaves of aspen ordinary (Populus tremula L.) has been conducted. Acute toxicity has been not revealed after intragastric introduction to rats and mice in doses from 2500 to 10000 mg/kg. Death of the animals has not been observed that did not allow to establish a lethal dose of the extract (LD50). In this connection, the studied preparation may be classified to Substance Hazard Class IV (low hazard substances) in compliance with State Standard GOST 12.1.007–76. High antioxidant (67,0 ± 1,12 %) and low prooxidant (25,1 ± 1,68 %) activity of the extract has been determined in the experiments in vitro. The obtained data indicate that biologically active substances of the extract being a direct antioxidant can suppress processes of peroxidation, and they don't have an ability to induce lipid peroxidation of cell membranes directly.

Keywords: aspen ordinary (Populus tremula L.), dry extract, acute toxicity, antioxidant activity, prooxidant activity

В последние годы проводится активный поиск растительных источников получения препаратов противовоспалительного действия для использования в комплексной терапии различных заболеваний, которые по сравнению с синтетическими препаратами имеют ряд преимуществ, основным из которых является мягкое воздействие на организм при отсутствии выраженной токсичности. В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что одним из механизмов противовоспалительного действия растительных лекарственных препаратов является подавление процессов свободнорадикального окисления в организме. При этом выявлено, что высокое содержание фенольных соединений обусловливает антиоксидантную активность извлечений из лекарственного растительного сырья, которые используются для коррекции антиоксидантного статуса организма [10, 11].

В указанном контексте наше внимание привлекли листья осины обыкновенной (*Populus tremula* L.), семейство ивовых *(Salicaceae*), род тополь (*Populus*), которые используются в народной медицине в качестве противовоспалительных, противоревматических, обезболивающих, противогеморроидальных средств, содержат разнообразный комплекс фенольных соединений [2, 5]. Несмотря на это, до настоящего времени отсутствуют официнальные лекарственные средства из данного вида сырья.

В связи с этим, на кафедре фармацевтической технологии Алтайского государственного медицинского университета была разработана рациональная технология экстракта листьев осины сухого, обеспечивающая высокое содержание в данном экстракционном препарате фенольных соединений (флавоноидов, фенологликозидов, фенолокислот, дубильных веществ) и проведена его стандартизация [4, 6].

Необходимыми этапами разработки нового лекарственного средства, обладающего противовоспалительным действием, является не только определение его специфической, но и выявление возможной антиоксидантной активности, а также изучение его безвредности.

Целью нашего исследования явилось определение острой токсичности экстракта листьев осины сухого и установление его

предполагаемого влияния на процессы свободно-радикального окисления.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлся экстракт листьев осины сухой, полученный методом реперколяции в батарее из пяти диффузоров, с использованием в качестве экстрагента спирта этилового 40%, с последующей вакуумной сушкой при температуре не выше 40–50 °С. Стандартизация препарата проводилась с использованием хроматографических (тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография), спектроскопических и спектрофотометрических методов. При этом выявлено высокое содержание разнообразных фенольных соединений, в том числе флавоноидов (гиперозид, рутин) – 6,89 ± 0,036% в пересчете на гиперозид, фенологликозидов (салицин, тремулацин) – 18,31 ± 0,854% в пересчете на салицин, фенолокислот (хлорогеновая, п-кумаровая, кофейная, феруловая кислоты) в пересчете на феруловую кислоту – 6,52 ± 0,324%, конденсированных дубильных веществ – 9,60 ± 0,251% [7].

Сырьем для получения сухого экстракта служили листья осины обыкновенной, заготовленные после окончания плодоношения в окрестностях г. Барнаула (конец июня 2009 г). Сырье сушили до воздушно-сухого состояния, упаковывали в двойные бумажные мешки и хранили в сухом прохладном месте.

Определение острой токсичности экстракта листьев осины сухого проводили согласно «Методическим указаниям по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [9] на сертифицированных половозрелых животных обоего пола – 40 белых крысах линии Wistar (массой 160–230 г) и 40 белых мышах (массой 20–25 г), полученных из вивария Института цитологии и генетики СО АН РФ и прошедших карантин в течение 14 суток. Содержание экспериментальных животных осуществлялось в стандартных условиях вивария на обычном рационе при свободном доступе к воде и пище, в условиях нормального температурного и светового режимов. Животные были разделены на 4 группы по 10 крыс (мышей) в каждой.

Первая группа животных получала перорально через желудочный зонд однократно или повторно через короткие интервалы времени (3–4 часа) в течение суток (в технически максимально возможных дозах) водный раствор экстракта листьев осины сухого в дозе 2500 мг/кг; вторая – в дозе 5000 мг/кг; третья – в дозе 7500 мг/кг; четвертая – в дозе 10000 мг/кг. Общая продолжительность наблюдения за животными после введения исследуемого препарата составила 14 дней. В первый день крысы (мыши) находились под непрерывным наблюдением.

Оценку общего состояния животных при введении экстракта проводили с учетом изменения поведенческих реакций, нервно-мышечной возбудимости, некоторых вегетативных функций, а также измеряли массу тела до введения изучаемого препарата и после окончания периода наблюдения [9].

Эксперименты проводили при строгом соблюдении требований Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей» (Страсбург, 1986 г.) и Федерального закона Российской Федерации «О защите животных от жестокого обращения» от 01.01.1997 г.

Процесс свободно-радикального окисления оценивали in vitro. В качестве основного показателя, определяющего состояние антиоксидантной системы, использовалась *общая антиоксидантная активность (ОАА)*. Антиоксидантную активность экстракта листьев осины сухого в виде 2%-ного водного раствора изучали с использованием модельной системы, которая базируется на способности различных объектов подавлять Fe^{2+}/аскорбат-индуцированное окисление ТВИН-80 in vitro с последующим фотоколориметрическим определением продуктов окисления (малонового диальдегида) после предварительного добавления щелочного раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК). Оптическую плотность (А) измеряли на фотоэлектроколориметре при длине волны $\lambda = 535$ нм [8].

Расчет антиоксидантного действия проводили по формуле

$$ОАА\,\% = ((A_к - A_о)\cdot 100)/A_к,$$

где $A_к$ – оптическая плотность в контроле; $A_о$ – оптическая плотность в опыте.

В качестве параметра оксидантной системы оценивали *общую проксидантную активность (ОПА)*. Суть биохимического метода определения прооксидантной активности в условиях in vitro заключается в способности исследуемых препаратов, в данном случае 2% водного раствора экстракта листьев осины сухого, окислять ТВИН-80, с последующим фотоколориметрическим определением концентрации продуктов окисления (малонового альдегида), ассоциированными тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Оптическую плотность (А) измеряли на фотоэлектроколориметре при длине волны $\lambda = 535$ нм [8].

Расчет прооксидантного действия проводили по формуле

$$ОПА\,\% = ((A_о - A_к)\cdot 100)/A_о,$$

где $A_к$ – оптическая плотность в контроле; $A_о$ – оптическая плотность в опыте.

Полученные в результате эксперимента данные обрабатывали статистически методом вариационных рядов с использованием *t*-критериев Стьюдента [1]. Результаты представлены в виде среднего значения *X* и ошибки среднего *m*. Достоверными считали различия при достигнутом уровне значимости $p < 0{,}01$.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении острой токсичности энтеральное введение крысам и мышам экстракта листьев осины сухого в дозах от 2500 до 10000 мг/кг массы тела животного не влияло на их общее состояние и не привело к гибели животных. Симптомы острого отравления отсутствовали. В первые сутки у трех крыс-самок наблюдалось незначительное увеличение дефекации при введении экстракта в дозе 10000 мг/кг крысы. В последующем все животные были активны, подвижны, с нормальной координацией движений, стандартной реакцией на внешние раздражители, обычной частотой и глубиной дыхательных движений, нор-

мальной консистенцией фекальных масс, частотой мочеиспускания и окраской мочи, с хорошим аппетитом и нормальным внешним видом. За период наблюдения мыши (самцы и самки) и крысы (самцы и самки) прибавили в массе (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная оценка массы тела крыс и мышей до и через 14 суток после введения экстракта листьев осины сухого ($X \pm m$)

Испытуемые дозы, мг/кг массы тела	Масса животных до введение препарата, г		Масса животных на 14-е сутки наблюдения, г		Прирост массы тела, г	
	самцы $n = 5$	самки $n = 5$	самцы $n = 5$	самки $n = 5$	самцы $n = 5$	самки $n = 5$
Крысы						
2500	184,0 ± 2,5	204,0 ± 5,1	250,0 ± 4,5*	240,0 ± 7,3*	66,0 ± 6,0	36,0 ± 7,0
5000	168,0 ± 3,7	228,0 ± 3,7	220,0 ± 7,1*	252,0 ± 6,6*	52,0 ± 5,8	30,0 ± 5,5
7500	184,0 ± 6,0	214,0 ± 6,0	233,0 ± 3,7*	236,0 ± 2,5*	49,0 ± 3,3	22,0 ± 5,8
10000	214,0 ± 2,5	220,0 ± 3,2	260,0 ± 4,5*	247,0 ± 2,0*	46,0 ± 4,0	27,0 ± 3,7
Мыши						
2500	22,77 ± 0,21	21,03 ± 0,29	25,13 ± 0,09*	22,83 ± 0,16*	2,36 ± 0,20	1,80 ± 0,26
5000	23,51 ± 0,35	22,01 ± 0,41	26,97 ± 0,35*	25,24 ± 0,53*	3,38 ± 0,43	3,23 ± 0,46
7500	23,15 ± 0,33	21,43 ± 0,40	27,63 ± 0,41*	25,20 ± 0,35*	4,48 ± 0,35	3,76 ± 0,20
10000	24,06 ± 0,13	21,81 ± 0,23	28,73 ± 0,26*	25,25 ± 0,66*	4,67 ± 0,25	3,44 ± 0,48

Примечание: * – статистически значимые изменения между массой животных на 14-е сутки наблюдения и массой животных до введения препарата ($p < 0,01$).

В течение 14 суток эксперимента гибели животных не отмечено, в связи с чем, установить LD_{50} не представилось возможным. Это позволяет считать исследуемый экстракт нетоксичным в испытанном диапазоне и варьировать его дозами в широких пределах (табл. 2).

Поскольку доза 10000 мг/кг не привела к смерти ни одного животного, можно сделать вывод, что $LD_{50} > 10000$ мг/кг и согласно ГОСТ 12.1.007–76 можно отнести исследуемый экспериментальный препарат к IV классу опасности (малоопасные вещества) [3].

Результаты анализов по определению антиоксидантной и прооксидантной активности экстракта листьев осины сухого представлены в табл. 3.

Таблица 2

Определение острой токсичности экстракта листьев осины сухого

Доза, мг/кг	2500	5000	7500	10000
Выжило	10	10	10	10
Погибло	0	0	0	0
Z	0	0	0	0
D	2500	2500	2500	2500
D·Z	0	0	0	0

Примечание: Z – показатель разницы между количеством погибших животных при использовании двух соседних доз; D – показатель разницы между количеством двух соседних доз.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в опытах in vitro для экстракта листьев осины сухого выявлена высокая активность в отношении процессов свободнорадикального окисления, что, по-видимому, связано с высоким содержанием разнообразных групп фенольных соединений, таких как флавоноиды, фенологликозиды, фенолокислоты, дубильные вещества, и их способностью влиять на изучаемый процесс. При этом исследуемый экстракт проявил как прооксидантную, так и антиоксидантную активность, причем последняя была выражена в значительно большей степени.

В связи с тем, что экстракт листьев осины сухой имеет высокие показатели общей антиоксидантной активности (67,0 ± 1,12 %), не исключено, что он обладает способностью улавливать свободные радикалы и за счет этого подавлять процессы пероксидации, выступая в роли прямого антиоксиданта. Показатели общей прооксидантной активностьи изучаемого экстракта (25,1 ± 1,68 %) свидетельствуют о том, что

он в незначительной степени стимулирует прооксидантную активность и вряд ли обладает способностью прямо индуцировать перекисное окисление липидов клеточных мембран, которое имитирует ТВИН-80.

Таблица 3

Показатели свободно-радикального окисления для экстракта листьев осины сухого in vitro

Номер эксперимента	Антиоксидантная активность		Прооксидантная активность	
	Оптическая плотность	ОАА, %	Оптическая плотность	ОПА, %
1	0,079	74	0,103	38
2	0,091	70	0,099	35
3	0,099	67	0,079	19
4	0,115	62	0,089	28
5	0,123	59	0,095	33
6	0,109	64	0,09	29
7	0,077	75	0,089	28
8	0,105	65	0,094	32
9	0,095	69	0,077	17
10	0,106	65	0,073	12
11	0,136	55	0,085	25
12	0,105	65	0,089	28
13	0,096	68	0,102	37
14	0,092	70	0,078	18
15	0,08	74	0,077	17
16	0,084	72	0,076	16
17	0,107	65	0,08	20
18	0,103	66	0,081	21
19	0,105	65	0,085	25
20	0,094	69	0,084	24
	$E_к = 0,303$		$E_к = 0,064$	
		67,0 ± 1,12		25,1 ± 1,68

Примечание: ОАА – общая антиоксидантая активность, ОПА – общая прооксидантная активность.

Заключение

При анализе результатов изучения острой токсичности при энтеральном введении животным (крысы, мыши) экстракта листьев осины сухого в дозах от 2500 до 10000 мг/кг признаков острой токсичности не выявлено, летальность отсутствовала, что не позволило установить LD_{50}. В связи с чем, изучаемый препарат может быть отнесен, согласно ГОСТ 12.1.007–76 к IV классу опасности (малоопасные вещества).

Суммируя данные экспериментов по изучению антиоксидантной и прооксидантной активности экстракта листьев осины сухого, можно заключить, что биологически активные вещества изучаемого экстракта способны подавлять процессы свободно-радикального окисления, моделируемые in vitro, о чем свидетельствуют высокие показатели общей антиоксидантной активности. Низкие показатели прооксидантной активности указывают на то, что данный экстракт не обладает способностью прямо индуцировать перекисное окисление липидов клеточных мембран.

Полученные данные подтверждают перспективность проведения дальнейших исследований по изучению противовоспалительной активности экстракта и получения на его основе безопасного эффективного противовоспалительного средства.

Список литературы

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л.: Медгиз, 1963. – 152 с.

2. Головкин Б.Н. Биологически активные вещества растительного происхождения. – М.: Наука, 2001.

3. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности: ГОСТ 12.1.007-76. – 2 с.

4. Ильина Е.И., Турецкова В.Ф., Лобанова И.Ю. Изучение состава фенольных соединений экстракта листьев осины обыкновенной сухого // Актуальные проблемы фармакологии и фармации: сб. науч. статей. – Вып. VII. – Барнаул, 2010. – С. 74–81.

5. Кьосев П.А. Полный справочник лекарственных растений. – М.: ЭКСМО, 2002. – 992 с.

6. Лобанова И.Ю. Выбор оптимальных параметров факторов, влияющих на процесс извлечения биологически активных веществ из листьев осины обыкновенной // Молодежь – Барнаул: материалы XI городской научно-практической конференции молодых ученых (17–20 ноября 2009 г.): в 2 т. / отв.ред. Б.А. Черниченко. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2010. – Т. 2. – С. 119–120.

7. Лобанова И.Ю., Турецкова В.Ф. Изучение состава основных биологически активных веществ гидрофильной фракции листьев осины обыкновенной // 35 лет фармацевтическому факультету АГМУ: итоги и перспективы: материалы научно-практической конференции, посвященной 35-летию фармацевтического факультета. – Барнаул, 2010. – С. 82–88.

8. Минеева Т.Н., Арбузова Я.С., Зверев Я.Ф. Определение антиоксидантной и оксидантной активности in vitro водных и спиртовых извлечений из листьев зимолюбки зонтичной, ортилии однобокой, грушанки круглолистной // Актуальные проблемы фармации: сб. науч. статей. – Вып. II. – Барнаул, 2005. – С. 79–82.

9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.

10. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям. – М.: Металлургия, 1990. – 427 с.

11. Шкарина Е.И., Максимова Т.В., Никулина И.Н. О влиянии биологически активных веществ на антиоксидантную активность фитопрепаратов // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – №6. – С. 40–47.

References

1. Belen'kiy M.L. Elementy kolichestvennoj otsenki farmakologicheskogo effekta [Elements of quantitative estimation of a pharmacological effect]. Leningrad: Medgiz, 1963. 152 p.

2. Golovkin B.N. Biologicheski aktivnye veschestva rastitel'nogo proiskhozhdeniya [Biologically active substances of phytogenous]. Moscow: Nauka. In 3 t. 2001.

3. Gosudarstvennyj standart 12.1.007-76. Vrednye veschestva. Klassifikatsiya i obschie trebovaniya bezopasnosti [State Standard (GOST) 12.1.007-76. Harmful substances. Classification and the general requirements of safety]. 2 p.

4. Il'ina E.I. Turetskova V.F., Lobanova I.Yu. Izuchenie sostava fenol'nykh soedinenij ekstrakta list'ev osiny sukhogo. Aktual'nye problemy farmakologii i farmatsii: Sb. nauch. statej [The study of phenolic compounds of the dry extract of leaves of Populus tremula L. Actual problems of pharmacology and pharmacy: collected scientific articles]. Issue VII. Barnaul, 2010. pp. 74–81.

5. K'osev P.A. Polnyj spravochnik lekarstvennykh rastenij [Complete manual of medicinal plants]. Moscow: EKSMO, 2002. 992 p.

6. Lobanova I.Yu. Vybor optimal'nykh parametrov faktorov, vliyayuschikh na protsess izvlecheniya biologicheski aktivnykh veshchestv iz list'ev osiny obyknovennoj. *«Molodezh – Barnaulu»: materialy 11 gorodskoj nauchno-prakticheskoj konferentsii molodykh uchenykh (*The youth – to Barnaul: materials of XI city scientifically-practical conference of young scientists (on November, 17-20th, 2009): in 2 t.). Otv. red. B.A. Chernichenko. Barnaul: Altajskij gos. univ., 2010. V. 2. pp. 119–120.

7. Lobanova I.Yu., Turetskova V.F. Izuchenie sostava osnovnykh biologicheski aktivnykh veshchestv gidrofil'noj fraktsii list'ev osiny obyknovennoj. *35 let farmatsevticheskomu fakul'tetu AGMU: itogi i perspektivy. Materialy nauchno-prakticheskoj konferentsii, posvyashchennoj 35-letiyu farmatsevticheskogo fakul'teta (*35 years to pharmaceutical faculty ASMU: results and prospects. Materials of the scientific-practical conference dedicated to the 35th anniversary of the pharmaceutical faculty). Barnaul, 2010. pp. 82–88.

8. Mineeva T.N., Arbuzova Ya.S., Zverev Ya.F. Opredelenie antioksidantnoj i oksidantnoj aktivnosti in vitro vodnykh i spirtovykh izvlechenij iz list'ev zimoljubki zontichnoj, ortilii odnobokoj, grushanki kruglolistnoj. Aktual'nye problemy farmatsii: Sb. nauch. statej [The identification of antioxidant and oxidant activity in vitro of water and alcohol extracts from leaves of Chimaphila umbellate L., Orthília secunda L., Pyrola rotundifolia L. Actual problems of pharmacology and pharmacy: collected scientific articles.] Issue II. Barnaul, 2005. pp. 79–82.

9. Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veschestv [Experimental (preclinical) study of new pharmacological substances manual] / Pod redaktsiej R.U. Khabrieva. Moscow: Meditsina, 2005. 832 p.

10. Sokolov S.Ya., Zamotaev I.P. Spravochnik po lekarstvennym rasteniyam [Manual on medicinal plant]. Moscow: Metallurgiya, 1990. 427 p.

11. Shkarina E.I., Maksimova T.V., Nikulina I.N. O vliyanii biologicheski aktivnykh veschestv na antioksidantuyu aktivnost' fitopreparatov. Khimiko-farmatsevticheskij zhurnal, 2001. no. 6. pp. 40–47.

Рецензенты:

Лампатов В.В., д-р биол. наук, профессор кафедры фармакологии ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, г. Барнаул;

Зуева Е.П., д-р биол. наук, профессор, зав. лабораторией онкофармакологии ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 20.07.2012.