

АНТИМИКРОБНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СИРЕНИ СОРТА «М.ШОЛОХОВ» IN VIVO И В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

ЯКОВЛЕВА О.А., ЛЮБАКОВСКАЯ Л.А.

У О «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Резюме. Исследована антимикробная активность отвара и спиртового извлечения листьев, цветков интактного растения и каллуса листового, цветкового происхождения сирени сорта «М.Шолохов» и антиоксидантная активность экстрактов этих объектов. Отвары листьев, цветков интактного растения и каллуса листового, и цветкового происхождения сирени противомикробного действия по отношению к *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* не проявляют. Антимикробной активностью по отношению к грамположительным микроорганизмам - *Staphylococcus aureus* обладают экстракты листьев, цветков интактного растения и каллусной культуры листового происхождения сирени. Степень ингибирования свободных катионных радикалов экстрактами из сирени составляет: $37,01 \pm 0,85\%$ (листья), $18,20 \pm 1,25\%$ (цветки), $17,72 \pm 0,45\%$ (каллус листового происхождения), $4,15 \pm 0,27\%$ (каллус цветкового происхождения).

Ключевые слова: сирень, каллус, антимикробная, антиоксидантная активность.

Abstract. Antimicrobial activity of the decoction and spirituous extraction of the leaves, flowers of the intact plant and callus of the leaf and flower origin of the lilac kind «M. Sholokhov» and antioxidant activity of the extracts of these objects has been investigated. Decoctions of the leaves, flowers of the intact plant and callus of the leaf and flower origin of the lilac don't show antimicrobial action in relation to *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Extracts of the leaves, flowers of the intact plant and callus culture of leaf origin of the lilac have antimicrobial activity in relation to gram-positive microorganisms - *Staphylococcus aureus*. The degree of inhibiting free cation radicals by the extracts from the lilac makes up: $37,01 \pm 0,85\%$ (leaves), $18,20 \pm 1,25\%$ (flowers), $17,72 \pm 0,45\%$ (callus of leaf origin), $4,15 \pm 0,27\%$ (callus of flower origin).

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, д.22, кв.72 – Яковлевой О.А.

Высшие растения являются потенциальным источником природных антиоксидантов, защищающих организм от стресса, нейтрализуя свободные радикалы. Образование свободных радикалов и активных форм кислорода происходит в ходе обмена веществ или других активных процессов, приводя биологическую систему к возникновению окислительного стресса [1]. Антиоксиданты – вещества, присутствующие в растениях в низких концентрациях и предотвращающие окисление различных субстратов [2].

В настоящее время большинство антиоксидантов производятся путём искусственного синтеза. Основным недостатком синтетических антиоксидантов является возникновение побочных эффектов при использовании *in vivo* [3]. В большинстве случаев антиоксидантами, являются вторичные метаболиты растений: каротиноиды, флавоноиды, коричные кислоты, бензойная кислота, фолиевая кислота, аскорбиновая кислота, токоферолы. Среди вторичных метаболитов наибольшую группу веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, представляют фенольные соединения [4]. В листьях, цветках интактного растения и в каллусной культуре листового, цветкового происхождения сирени сорта «М.Шолохов» присутствуют: флавоноиды (рутин, астрагалин, кемферол-3 рамноглюкозид), фенольные кислоты (кофейная, феруловая, ванилиновая гидроксикофейная, пара-гидроксифенилуксусная, пара-гидроксибензойная, пара-кумаровая, о-гидроксикоричная кислота), простые фенолы (тиразол, резорцин), фенилпропаноиды (сирингин, актеозид) [5,6,7]. Следовательно, характеризуясь разнообразным спектром фенольных соединений листья, цветки и каллусная культура сирени могут являться одним из источников антиоксидантов. Кроме того, известно, что ряд флавоноидов обладает антимикробным действием [8]. Тем не менее, данные об антиоксидантных и антимикробных свойствах листьев и цветков интактного растения сирени ограничены, а каллусная культура не изучена.

Цель исследования – изучить антимикробную активность отвара и спиртового извлечения листьев, цветков интактного растения и каллуса листового, цветкового происхождения сирени сорта «М.Шолохов» и антиоксидантную активность экстрактов этих объектов.

Методы

Объектами исследования явились цветки, листья интактного растения и каллусная культура листового, цветкового происхождения сирени (*Syringa vulgaris* (L.)) сорта «М. Шолохов». Цветки и листья сирени собирали в сухую погоду, в мае месяце во время цветения, сушили в хорошо проветриваемом помещении, при постоянном доступе воздуха. Культуру каллусной ткани выращивали на полутвёрдой агаризованной среде Мурасиге и Скуга (MS), pH среды 5,6-5,8 в культуральных помещениях при искусственном освещении люминесцентными лампами ЛБ-40 (освещенность 3000 лк) при 12-часовой смене светового и темного периодов, при температуре $26\pm 1^{\circ}\text{C}$, влажности 70% [9]. Сырую биомассу каллусной культуры сирени подвергали лиофильной сушке на установке «Иней 3-2 №11192» при температуре -40°C и давлении 0,2 атмосфер до постоянного веса каллуса. Антимикробную активность отвара и спиртового извлечения листьев, цветков интактного растения и каллуса

листового, и цветкового происхождения сирени сорта «М.Шолохов» исследовали на трех типах микроорганизмов: *Escherichia coli* (АТСС 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (АТСС 27853) и *Staphylococcus aureus* (АТСС 25923) с использованием метода диффузии в агар [10]. Для исследования применяли чистые культуры микроорганизмов, которые предварительно инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов на скошенном мясопептонном агаре (МПА). Стандартную бактериальную суспензию готовили на стерильном 0,9% растворе натрия хлорида. Для этого бактериологической петлей вносили исследуемую культуру в стерильный флакон со стерильным физраствором и доводили концентрацию микроорганизмов до оптической плотности 10 единиц по стандартам мутности ГИСК, соответствующему 5x10 микробных тел/мл. Расплавленный и остуженный до 56°C МПА разливали в чашки Петри. С помощью автоматической пипетки в стерильных условиях в чашки Петри на застывший агар вносили по 1 мл соответствующей взвеси микроорганизмов. Распределяли микроорганизмы стерильным шпателем по всей поверхности агара, инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Избыток культуры сливали в дезинфицирующий раствор. На чашке с микроорганизмами делали 5 лунок диаметром 6 мм. В 4 лунки вносили по 20 мкл водного извлечения листьев, цветков, каллуса листового и цветкового происхождения, приготовленного в соответствии с требованиями статьи «Настои и отвары» ГФ СССР XI изд., вып. 2 [11]. В качестве контроля в пятую лунку вносили воду очищенную. Параллельно получали спиртовые извлечения из листьев, цветков, каллуса листового и цветкового происхождения, путем их экстрагирования 96° спиртом этиловым в соотношении 1:60 в течение 30 минут, затем спирт отгоняли досуха, а сухие остатки растворяли в воде очищенной. Пробы инкубировали 24 часа при температуре 37°C. Учет результатов проводили по росту бактерий вокруг лунок с извлечением [12]. Антиоксидантную активность полученных экстрактов изучали спектрофотометрическим методом с использованием реактива DPPH (2,2 – дифенил – 1 пикрилгидразил C₁₈H₁₂N₅O₆) - источника свободных катионных радикалов [13]. Навеску листьев и цветков сирени и лиофильно высушенный до постоянной массы каллус листового и цветкового происхождения, экстрагировали 96% этанолом в соотношении 1: 60 на водяной бане с обратным холодильником в течение 40 минут при периодическом перемешивании. Экстракты центрифугировали в течение 5 минут со скоростью 3000 об/мин. К 0,6 мл извлечения добавляли 4,2 мл 0,01% раствора DPPH. Через 30 минут измеряли оптическую плотность при длине волны 517 нм на спектрофотометре СФ-46. В качестве раствора сравнения использовался метанол.

Антиоксидантную активность (А (%)) рассчитывали по формуле:

$$A (\%) = \frac{(A_0 - A_i) \cdot 100\%}{A_0}$$

где A_0 – оптическая плотность раствора DPPH,

A_i – оптическая плотность раствора DPPH, после добавления извлечения.

Фенольные соединения извлекали из лиофильно высушенного сырья горячим 96% этанолом. Содержание суммы фенольных соединений определяли спектрофотометрически после реакции с реактивом Folin- Ciocalteu при 720 нм [14]. Калибровочный график строили по галловой кислоте.

Результаты и обсуждение

При анализе роста микроорганизмов на МПА было установлено, что вокруг лунок с отварами культур *in vivo* и *in vitro* и в контроле наблюдали рост микроорганизмов, что свидетельствует об отсутствии противомикробного действия отваров по отношению к *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Антимикробную активность по отношению к грамположительным микроорганизмам – *Staphylococcus aureus* проявляют спиртовые извлечения листьев, цветков интактного растения сирени сорта «М.Шолохов», а так же каллусная культура листового происхождения сирени сорта «МЛШолохов» (таблица 1-4).

Таблица 1

Антимикробное действие листьев сирени

Исследуемый объект	Вид микроорганизма		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Отвар	Рост колоний	Рост колоний	Рост колоний
Спиртовое извлечение	Рост колоний	Рост колоний	Задержка роста
Контроль	Рост колоний	Рост колоний	Рост колоний

Таблица 2

Антимикробное действие цветков сирени

Исследуемый объект	Вид микроорганизма		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Отвар	Рост колоний	Рост колоний	Рост колоний
Спиртовое извлечение	Рост колоний	Рост колоний	Задержка роста
Контроль	Рост колоний	Рост колоний	Рост колоний

Таблица 3

Антимикробное действие каллуса сирени цветкового происхождения

Исследуемый объект	Вид микроорганизма		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Отвар	Рост колоний	Рост колоний	Рост колоний
Спиртовое извлечение	Рост колоний	Рост колоний	Рост колоний
Контроль	Рост колоний	Рост колоний	Рост колоний

Антимикробное действие каллуса сирени листового происхождения

Исследуемый объект	Вид микроорганизма		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Отвар	Рост колоний	Рост колоний	Рост колоний
Спиртовое извлечение	Рост колоний	Рост колоний	Задержка роста
Контроль	Рост колоний	Рост колоний	Рост колоний

Поскольку в основе определения антиоксидантной активности лежит реакция растворённого в метаноле DPPH с образцом антиоксиданта (АН): $DPPH^* + АН \rightarrow DPPH-H + A^*$, то после добавления к раствору DPPH* извлечения из листьев, цветков сирени, листового и цветкового каллуса сирени сорта «М.Шолохов» происходит связывание антиоксидантов со свободными катионными радикалами DPPH*. В результате реакции происходит восстановление DPPH* антиоксидантом, что проявляется снижением пурпурно-синей окраски DPPH в метаноле. Антиоксидантную активность оценивали по степени восстановления DPPH экстрактами листьев, цветков, каллуса листового, цветкового происхождения сирени, что проявлялось в снижении интенсивности окраски DPPH и уменьшении оптической плотности DPPH в метаноле. Извлечение из листьев нативного растения снижает количество свободных перекисных радикалов на $37,01 \pm 0,85\%$ по сравнению с контролем, что указывает на его высокую степень антиоксидантной активности. Антиоксидантная активность цветков нативного растения в 2 раза ниже, чему листа. В культуре *in vitro* антиоксидантная активность каллуса листового происхождения была выше по сравнению с каллусом цветкового происхождения в 4 раза. Доказательством того, что именно фенольные соединения обладают высокой антиоксидантной активностью, является корреляция между содержанием суммы фенольных соединений в соответствующих объектах с их антиоксидантной активностью (таблица 5).

Содержание фенольных соединений и степень ингибирования свободных радикалов экстрактами из листьев, цветков, каллуса листового, цветкового происхождения сирени сорта «М.Шолохов»

Объект	Ингибирование свободных радикалов, %	Сумма фенольных соединений, мг/г сухого веса
Листья	$37,01 \pm 0,85$	$23,35 \pm 0,50$
Цветки	$18,20 \pm 1,25$	$24,14 \pm 0,28$
Каллус листового происхождения	$17,72 \pm 0,45$	$19,37 \pm 0,32$
Каллус цветкового происхождения	$4,15 \pm 0,27$	$4,86 \pm 0,03$

Кроме того, антиоксидантная активность сравнивалась с таковой широко используемого флавоноида – кверцетина. В аналогичных условиях антиоксидантная активность 0,5% спиртового раствора кверцетина составила $26,24 \pm 0,65\%$, что подтверждает высокую антиоксидантную активность исследуемых объектов.

Заключение

Антимикробную активность по отношению к грамположительным микроорганизмам – *Staphilococcus aureus* проявляют экстракты листьев, цветков интактного растения сирени сорта «М.Шолохов», а так же каллусная культура листового происхождения сирени сорта «М.Шолохов». Отвары листьев, цветков интактного растения сирени, а так же каллусной культуры сирени листового происхождения противомикробного действия по отношению к грамотрицательным энтеробактериям кишечной группы *Escherichia coli*, к микроорганизмам с мощной, плотно прилегающей слизистой оболочкой *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* не оказывают.

Антиоксидантной активностью обладают цветки и листья нативного растения сирени и каллусной культуры сирени (листового и цветкового происхождения) сорта «М.Шолохов». Нативное растение обладает большей антиоксидантной активностью, чем каллусная культура. В листьях сирени как *in vivo*, так и *in vitro* антиоксидантная активность выше, чем в цветках.

Литература

1. Исследования по созданию иммуномодулирующего средства на основе коры сирени обыкновенной / В. А. Куркин [и др.] // Актуальные проблемы современной химии: тезисы междунар. конф., 2000. – С. 35-36.
2. Особенности роста и накопления ФС в каллусе сирени при различном уровне минерального питания и освещения / Л. А. Любаковская [и др.] // Вестник ВГМУ. – 2007. – Т. 6, № 4. – С. 156-161.
3. Коноплева, М. М. Фармакогнозия: природные биологически активные вещества / М. М. Коноплева. – Витебск: ВГМУ, 2002. – С. 119-147.
4. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent / R. E. Wrolstad [et al.] // Methods in Enzymology. – 1999. – Vol. 299. – P. 152-178.
5. Chen, H. Separation and determination of flavonoids and other phenolic compounds in cranberry juice by high-performance liquid chromatography / H. Chen, Y. Zuo, Y. Deng // Journal of Chromatography A. – 2001. – Vol. 913. – P. 387-394.
6. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище: Р4.1.1672-03. – Москва: Минздрав России, 2004.