

ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОМОДУЛЮЮЧОЇ ДІЇ СУХИХ ЕКСТРАКТІВ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ ASPERULA L.

Шемчук Н.С.¹, Ільїна Т.В.¹, Ковальова А.М.¹, Кашипур Н.В.²

¹ Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

*² ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова НАМН України»,
м. Харків, Україна*

ШЕМЧУК Н. С.

кандидат фармацевтичних наук, асистент,

асистент кафедри фармакогнозії

Національний фармацевтичний університет

м. Харків, Україна

Погіршення стану навколишнього середовища та соціальних умов життя населення в останні роки зумовлює зміну імунологічної реактивності організму та викликає зрештою розвиток вторинних імунодефіцитів. Тому, особливої актуальності набуває проблема пошуку препаратів, які мають позитивну імуномодулюючу активність. Особливий інтерес викликають імуномодулюючі препарати рослинного походження. Вони не лише ефективно підвищують адаптаційні можливості організму, але і відновлюють його порушені в процесі частих захворювань функціональні можливості. Рослинні імуностимулятори діють фізіологічно, не кумулюють, мають значну різницю між терапевтичною та токсичною дозами [1, с. 236, 3, с. 24, 8, 15, с. 119, 18, с. 14]. Завдяки поєднанню біологічно активних речовин (БАР), рослини здатні забезпечувати багатоплановий вплив на організм (імуностимулюючу, протизапальну, антимікробну, противірусну, детоксикаційну та ін.) [2, с. 70, 4, с. 51, 5, с. 55, 7, с. 200]. На фармацевтичному ринку імуномодуляторів рослинного походження нараховується незначна кількість. Тому актуальним для медицини

та фармації є пошук та розробка ефективних лікарських засобів рослинного походження з імуномодулюючою дією.

Метою дослідження стало вивчення впливу (імуномодулюючої дії) сухих екстрактів найбільш поширених на території України представників роду Маренка (*Asperula* L.) родини Маренові (*Rubiaceae* Juss.), а саме, маренки запашної – *Asperula odorata* L., маренки сланкої – *Asperula humifusa* M. Bieb. Besser та маренки восьмилисткової – *Asperula octonaria* Klokov на трансформаційну і функціональну активність макрофагів і їх гематогенних попередників.

Матеріали і методи.

Об'єктами дослідження були сухі екстракти маренки запашної, маренки сланкої та маренки восьмилисткової, отримані шляхом комплексної переробки сировини, а саме екстракції водою при нагріванні шроту, що залишився після послідовного отримання із відповідної сировини ліпофільних та фенольних комплексів.

Визначення складу фенольних сполук проводили методом ВЕРХ, вмісту груп БАР – спектрофотометричним методом [20, с. 196, 21, с. 4465].

Імуномодулюючу дію вивчали *in vitro* в реакції макрофагальної трансформації мононуклеарів периферичної крові [9, с. 77, 12, с. 234, 13, с. 4, 14, с. 85, 16, с. 71, 17, с. 28, 19, с. 205].

Первинні культури імунокомпетентних клітин одержували з гепаринізованої крові донорів шляхом відстоювання при температурі 4 – 8 °С. Мононуклеарні клітини крові культивували в середовищі 199 з 10 % фетальної сироватки. До живильного середовища додавали по 100 ОД/см натрієвої солі бензилпеніциліну та стрептоміцину, а також амфотеріцин В.

Сухі екстракти вносили до первинних культур імунокомпетентних клітин у кількості 5 мкг/мл, 50 мкг/мл і 100 мкг/мл та інкубували при 37 °С протягом 23 годин. З метою оцінки фагоцитарної активності макрофагів і їх попередників через 23 години культивування в культуру вносили референтний штам *Staphylococcus aureus*-209P, інактивований прогріванням.

Оцінку імуномодулюючої дії ФК на імунокомпетентні клітини проводили за наступними показниками:

- ПМТМ - показник макрофагальної трансформації мононуклеарів;
- фагоцитарний індекс (ФІ);
- фагоцитарне число.

Контроль включав постановку реакції макрофагальної трансформації мононуклеарів периферичної крові без додавання досліджуваних екстрактів. Одержані показники статистично обробляли за допомогою програми «Microsoft Excel» [11, с. 182].

Результати досліджень та їх обговорення.

В результаті досліджень встановлено вміст гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, суми фенольних сполук та танінів у отриманих екстрактах (табл. 1).

Таблиця 1

Група БАР	Вміст у сухому екстракті, %		
	<i>Asperula odorata</i>	<i>Asperula humifusa</i>	<i>Asperula octonaria</i>
Гідроксикоричні кислоти	10,19±0,10	6,16±0,10	7,45±0,10
Флавоноїди	2,25±0,07	2,14±0,07	1,75±0,05
Сума поліфенолів	50,00±1,65	52,56±1,83	58,17±1,97
Таніни	10,42±0,38	7,85±0,25	9,77±0,32

При дослідженні фенольних сполук екстрактів методом ВЕРХ виявлено, що всі вони містять хлорогенову кислоту, о-кумарову та п-кумарову кислоти, 4,5-дикофеїлхінну кислоту, рутин, кверцетин та його глікозиди.

При введенні сухих екстрактів *Asperula odorata*, *Asperula humifusa* та *Asperula octonaria* в культури гематогенних попередників макрофагів не спостерігали різниці у механізмі їх дії на імунокомпетентні клітини периферичної крові (табл. 2).

Вплив сухих екстрактів *Asperula odorata*, *Asperula humifusa* та *Asperula octonaria* на показники макрофагальної трансформації й фагоцитарної активності гематогенних попередників макрофагів

Сухий екстракт	Концентрація, мкг/мл	ПМТМ, %	Фагоцитарний індекс, %	Фагоцитарне число
<i>Asperula odorata</i>	5	45,0 ± 4,3	56,6 ± 2,6	10,3 ± 0,6
	50	46,6 ± 3,4	59,4 ± 3,3	10,8 ± 1,1*
	100	51,2 ± 2,4*	67,7 ± 2,6*	11,7 ± 1,1*
<i>Asperula humifusa</i>	5	45,6 ± 3,3	54,8 ± 2,3	10,9 ± 1,2
	50	48,2 ± 2,2	61,3 ± 2,4*	11,3 ± 0,8*
	100	53,5 ± 4,3*	66,8 ± 3,4*	11,8 ± 1,2*
<i>Asperula octonaria</i>	5	45,0 ± 3,4	58,5 ± 4,1	10,8 ± 1,1
	50	51,5 ± 4,0*	63,1 ± 2,2*	11,8 ± 0,9*
	100	54,4 ± 2,9*	68,7 ± 3,6*	12,3 ± 1,3*
Контроль	-	32,6 ± 3,4	46,4 ± 2,8	7,6 ± 0,6

Примітка. * – $P < 0,05$ у порівнянні до показника контролю

Сухі екстракти значною мірою стимулюють трансформаційну та фагоцитарну активність мононуклеарних клітин периферичної крові.

При внесенні екстракту маренки запашної до первинної культури імунокомпетентних клітин в дозі 5 мкг/мл відзначається підвищення трансформаційної активності мононуклеарів периферичної крові на 38 %, фагоцитарного індексу – на 22 %, фагоцитарного числа – на 35 % порівняно з інтактним контролем. Сухий екстракт маренки сланкої, використаний у тій же дозі, збільшив трансформаційну активність мононуклеарів на 40 %, фагоцитарний індекс – на 18 % і фагоцитарне число – на 43 %, а маренки восьмилисткової – на 38 %, 26 %, та 42 % відповідно.

Збільшення дози сухих екстрактів до 50 мкг/мл призвело до більш вираженої стимуляції трансформаційної і фагоцитарної активності макрофагів і

їх попередників. Так, екстракт маренки запашної збільшив трансформаційну активність мононуклеарів на 43 %, фагоцитарний індекс – на 28 %, фагоцитарне число – на 42 % порівняно з контролем. З використанням екстракту маренки сланкої ПМТМ збільшився на 48 %, фагоцитарний індекс – на 32 %, фагоцитарне число – на 49 %. Сухий екстракт маренки восьмилистокової збільшив трансформаційну активність на 58 %, фагоцитарний індекс на 36 % і фагоцитарне число – на 55 %.

При використанні досліджуваних екстрактів в дозі 100 мкг/мл відзначається максимальна стимуляція функціональної активності імункомпетентних клітин. Так, екстракт *Asperula odorata* збільшив трансформаційну активність мононуклеарів на 57 %, фагоцитарний індекс – на 46 % і фагоцитарне число – на 54 % у порівнянні з контролем. Екстракт *Asperula humifusa* підвищив трансформаційну активність на 64 %, фагоцитарний індекс – на 44 %, а фагоцитарне число – на 56 %. Сухий екстракт *Asperula octonaria* підвищив трансформаційну активність на 67 %, фагоцитарний індекс – на 48 %, а фагоцитарне число – на 62 %.

Отже, досліджені субстанції проявляють дозозалежну стимулюючу дію на трансформаційну та фагоцитарну активність макрофагів і їх мононуклеарних попередників.

Порівняльна оцінка активності сухих екстрактів *Asperula odorata*, *Asperula humifusa* та *Asperula octonaria* показала, що більш виражену імуномодулюючу дію, при використанні доз від 5 до 100 мкг/мл, має екстракт *Asperula octonaria*.

У ході експерименту отримано непрямі дані, які вказують на відсутність у досліджених екстрактів токсичності відносно макрофагів і їх мононуклеарних попередників у дозовому діапазоні 5 – 100 мкг/мл, що підтверджує отримані нами дані в експериментах з вивчення токсичності [6, с. 143, 10, с. 156].

Одержані дані про наявність позитивної імуномодулюючої активності сухих екстрактів підтверджують перспективність їх дослідження з метою пошуку нових засобів і принципів корекції імунодефіцитів.

Висновки

Сухі екстракти *Asperula odorata*, *Asperula humifusa* та *Asperula octonaria* проявляють виражену стимулюючу дію на трансформаційну активність імунокомпетентних клітин крові та підвищують їх функціональні характеристики. Встановлено, що більш виражену імуномодулюючу дію має сухий екстракт *Asperula octonaria* в дозовому діапазоні концентрацій від 5 до 100 мкг/мл. Результати досліджень підтверджують перспективу використання сухих екстрактів видів маренок з метою корекції імунопатологічних станів.

Використана література

1. Аткинс Р. В. Природная альтернатива лекарствам при лечении и профилактике болезней / Р. В. Аткинс // Москва: РИПОЛ. – 1999. – 480 с.
2. Гарник Т. П. Деякі аспекти застосування лікарських рослин та рослинної сировини в медицині / Т. П. Гарник, Ф. А. Мііченко, Т. К. Шураєва // Фітотерапія. – 2002. – № 1–2. – С. 70 – 72.
3. Гарник Т. П. Эхинацея пурпурная как лекарственное растение и перспективы применения новых лекарственных препаратов из этого растения / Т. П. Гарник, В. М. Фролов, Н. А. Пересадин // Проблемы екологічної та медичної генетики і клінічної імунології: Зб. наук. праць. – Київ. – 2007. – № 1 – 2 (76 – 77). – С. 19 – 39.
4. Гарник Т. П. Ефективність препаратів рослинного походження депривіту та імуноплюсу в лікуванні хворих з синдромом хронічної втоми / Т. П. Гарник, В. М. Фролов, Н. А. Пересадин // Український медичний альманах. – 2008. – Том 11, № 5. – С. 50 – 56.
5. Гарник Т. П. Стан системи фагоцитуючих макрофагів у хворих з синдромом хронічної втоми при лікуванні препаратами рослинного походження депривітом та імуноплюсом / Т. П. Гарник, В. М. Фролов, Н. А. Пересадин // Український медичний альманах. – 2008. – Т.11. № 6. – С. 53 – 57.
6. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / за редакцією член-кор. АМН України О. В. Стефанов. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.

7. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология / Г. Н. Дранник // 2-е изд. – Москва: МИА. – 2006. – С. 193 – 202.
8. Іщенко М. В. Патент № 50189 UA. МПК А61К 36/185, А61Р 31/00, А61Р 37/00 Лікувально-профілактичний засіб з імуномодельюючою дією, активний у відношенні вірусу грипу / М.В. Іщенко М.Л. Сятиня // заяв. № u200913076, від 15.12.2009; опубл. 25.05.2010, бюл. № 10.
9. Киселева Е. П. Использование микрометода для бласттрансформации лимфоцитов человека и животных / Е. П. Киселева, А. С. Цвейбах, Е. И. Гольдман, Н. В. Пигарева // Иммунология . – 1985. – № 1. – С.76 – 78.
10. Клиническая токсикология / Под ред. И. В.Марковой в 2-х т., СПб: Интермедика, 1998. – С. 154-162.
11. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич // Киев: Морион. – 2000. – 320 с.
12. Никитин В. М. Справочник методов иммунологии / В. М. Никитин // Кишинев: Штинца. – 1982. – 304 с.
13. Пинегин Б. В. Современные представления о стимуляции антиинфекционного иммунитета с помощью иммуномодулирующих препаратов / Б. В. Пинегин // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – № 12. – С. 3 – 8.
14. Столяров И. Д. Иммунодиагностика и иммунокоррекция в клинической практике / И. Д. Столяров // СПб.: Сотис. – 2003. – 176 с.
15. Фролов В. М. Ефективність вітчизняних препаратів рослинного походження Артїхолу та Імуноплюсу в медичній реабілітації хворих на неалкогольний стеатогепатит, поєднаний із синдромом підвищеної стомлюваності, та динаміка показників клітинної ланки імунітету / В. М. Фролов, Л. В. Кузнецова, М. О. Пересадін, Я. А. Соцька // Український медичний часопис. – 2008. – № 5 (67). – С. 119 – 124.
16. Фролов В. М. Моноклональные антитела в изучении показателей клеточного иммунитета у больных / В. М. Фролов, Н. А. Пересадин, И. Н. Баскаков // Лаборат. дело. – 1989. – № 6. – С. 71 – 72.

17. Фролов В. М. Определение фагоцитарной активности моноцитов периферической крови у больных / В. М. Фролов, Н. А. Пересадин, И. Я. Пшеничный // *Лаборат. дело.* – 1990. – № 9. – С. 27 – 29.
18. Хаитов Р. М. Вторичные иммунодефициты: клиника, диагностика, лечение / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // *Иммунология.* – 1999. – № 1. – С. 14 – 17.
19. Kvatchoff V. G. Application de subculture de leucocytes en test-système devaluation immunomodule de vims in vitro / V. G. Kvatchoff // *Abstracts of iV International Congress Cell Biology.* – Montreal (Canada). – 1988. – P. 205.
20. Phytochemical research of *Asperula odorata* L. / [C. Bicchi, C. Brunelli, C. Cordero, P. Rubiolo et al.] // *J. Chromatogr. A.* — 2004. — Vol. 1024, № 1–2. — P. 195–207.
21. Tzakou O. Comparative HPLC analysis of polyphenolic compounds in four species of *Galium* L. / O. Tzakou, E. Verykokidou, C. Harvala // *Journal of liquid chromatography.* – 1994. – Vol. 17(20). – С. 4463–4467.