

ДОСЛІДЖЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ГУСТОГО ЕКСТРАКТУ ЛИСТЯ ГОРІХА ВОЛОСЬКОГО

Л.М.Малоштан, О.Г.Башура, Т.М.Ковальова

Національна фармацевтична академія України

Ключові слова: густий екстракт; протизапальна активність; антимікробна дія; виразка; горіх волоський

Проведене експериментальне дослідження специфічної активності густого екстракту листа горіха волоського — нового перспективного фітопрепарату для лікування запальних та інфекційних захворювань шлунково-кишкового тракту. Встановлено, що препарат виявляє протизапальну, ранозагоюючу, антиоксидантну та антимікробну дію. Дослідженнями на моделях гістамінового і карагенінового запалення, експериментального гепатиту, асептичного ураження м'яких тканин піддослідних тварин доведено, що найбільш ефективною є доза препарату 1 мг/кг, яка не поступається препаратам порівняння: протизапальному — ортофену, гепатопротекторному — силібору, ранозагоюючому — обліпиховій олії. Згідно з отриманими результатами препарат може рекомендуватися для комплексної терапії виразкової хвороби шлунка і 12-типалої кишки.

У сучасній терапії виразкових уражень шлунково-кишкового тракту (ШКТ) поряд з синтетичними широко використовуються препарати на основі біологічно активних речовин рослинного походження [12, 13, 14]. Перевага останніх не потребує доведення, тому актуальним є пошук нових методів лікування вказаної патології і розробка нових високоефективних вітчизняних препаратів, сировиною для яких є природні ресурси України.

Відомо, що простагландини здатні перетворюватися в циклічні ендоперекиси, метаболізм яких супроводжується утворенням вільних радикалів, які є додатковими чинниками запалення і викликають пошкодження мембран клітин. Це стало передумовою для вивчення антиоксидантної активності густого екстракту листа горіха волоського (ГЕЛГВ). Попередні дослідження, проведені співробітниками кафедри косметології та ароматології НФАУ, свідчать, що до хімічного складу листа горіха волоського входить комплекс біологічно активних речовин (фла-

воноїди — югланін, авікулярин, гіперозид, кверцетин, кемпферол; дубильні речовини — похідні пірогалолу), який проявляє протизапальну, ранозагоюючу, антимікробну, антиоксидантну активність [4, 8].

Підставою для виконання цієї науково-дослідної роботи став розроблений на кафедрі косметології та ароматології НФАУ новий фітопрепарат, запропонований для терапії виразкової хвороби шлунка та інших виразкових уражень ШКТ — густий екстракт листа горіха волоського. Найвність комплексу вищевказаних біологічно активних сполук в ЛГГ, а також розробка нової лікарської форми зумовили проведення нами досліджень фармакологічної активності препарату на кафедрі анатомії з основами фізіології НФАУ.

Матеріали та методи

Вивчення препарату проводили на білих безпородних щурах і мишах, вирощених у розпліднику ЦНДЛ НФАУ. Тварин стандартизували за біохімічними та клінічними показниками крові.

Для вивчення протизапальної активності на осередку ексудатії були застосовані дві моделі запалення різного генезу: модель гістамінового і карагенінового набряків.

Модель гістамінового запалення характеризує переважно поверхневі зміни мембран клітин, судин периферичного кровообігу і дає змогу дати оцінку альтеративній фазі запалення [2].

Досліди проводили на білих мишах масою 18-20 г. Гістаміновий набряк викликали введенням в лапку тварини 1%-ного розчину гістаміну в дозі 0,1 мл [11]. ГЕЛГВ (водний розчин) вводили перорально за годину до введення гістаміну в дозах 1, 5, 10, 20 мг/кг маси тварини. Через 40 хв. (максимум розвитку запалення) тварин забивали і оцінювали протизапальний ефект за величиною маси лапки.

Модель карагенінового набряку дозволяє проаналізувати наявність антиексудативних властивостей ГЕЛГВ і оцінити його вплив на метаболізм і вивільнення простагландинів, які є провідними медіаторами запалення даної моделі і відіграють вирішальну роль у виникненні ранніх судинних змін. Карагеніновий набряк

Протизапальна активність ГЕЛГВ на моделі гістамінового набряку

Умови досліджу	Доза, мг/кг	Величина набряку, ум. од.	Активність відносно контролю, %
Контроль	-	153,3±13,5	-
ГЕЛГВ	1	48,8±7,3*	68,1
	5	47,3±6,8*	69,1
	10	50,8±7,6*	66,8
	20	68,0±9,1*	55,6
Ортофен	8	68,5±10,3*	55,3

Примітка: * $p < 0,05$ відносно контролю

викликали у щурів масою 180-220 г у відповідності з методичними рекомендаціями [2]. ГЕЛГВ вводили перорально в досліджуваних дозах 1 мг/кг, 5 мг/кг. Контрольна група тварин отримувала воду. Через годину в лапу тварин вводили 1%-ний розчин карагеніну. Через 3 години (максимум розвитку запалення) вимірювали об'єм здорової і ураженої лапи за допомогою онкометра за Захаревським [3]. Антиексудативну активність ГЕЛГВ визначали за ступенем зменшення набряку в дослідних тварин порівняно з контролем. Препаратом порівняння при оцінці протизапальної активності екстракту був ортофен (виробництва ФФ "Здоров'я", серія 260400) в дозі 8 мг/кг, що відповідає ЕД₅₀ [10].

Антиоксидантна активність вивчалася на моделі експериментального гепатиту у мишей, викликаного внутрішньом'язовим введенням чотирихлористого вуглецю в дозі 0,5 мл на 100 г маси тварини. Інтоксикація СС14 є класичною моделлю пошкодження мембран [5].

Препаратом порівняння був класичний гепатопротектор силібор у дозі 25 мг/кг (виробництва ФФ "Здоров'я", серія 146013). ГЕЛГВ вводили перорально в дозі 1 мг/кг у вигляді водного розчину за 1 годину до введення гепатотоксину. Через 24 години тварин забивали і визначали досліджувані показники. Рівень ПОЛ визначали за кінцевим продуктом МДА і ДК.

Зазвичай ряд рослинних засобів, що виявляють протизапальну активність, проявляють антимікробну дію. Дані літератури свідчать про наявність даного ефекту у витяжках з листя горіха волоського [9]. Вивчення антимікробної активності ГЕЛГВ було проведене нами на кафедрі мікробіології НФАУ під керівництвом проф. І.Л.Дикого загальноприйнятим в мікробіологічній практиці методом [7]. Як тест-штами використовували культури, отримані з ДІСК медичних біологічних препаратів ім. Тарасевича: *S.aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P.aeruginosa* ATCC 9027, *B.subtilis* ATCC 6633, *C.albicans* ATCC

Таблиця 1

885-653. Вплив ГЕЛГВ на процеси регенерації проводили на моделі асептичного пошкодження м'яких тканин у дозі 1 мг/кг (ефективній). Модель відтворювали на білих безпородних щурах масою 200-220 г. Некротичне запалення викликали підшкірним введенням 9% розчину оцтової кислоти в об'ємі 0,5 мл на тварину. Одночасно внутрішньоочеревинно вводили декстран у дозі 300 мг/кг для підвищення реактивності організму тварини [6].

У контролі розвиток запальної реакції на місці ін'єкцій відмічали в першу добу і спостерігали протягом наступних 5 діб.

ГЕЛГВ вводили перорально у вигляді водного розчину, починаючи з другого дня експерименту. Контрольна група тварин отримувала воду. Оцінку регенеративних властивостей проводили за зміною площі рани і за швидкістю її загоєння. В якості препарату порівняння використовували олію обліпихи, яка є ефективним протизапальним і ранозагоюючим засобом (виробник — вітамінний завод, м. Київ, серія 785300).

Результати та їх обговорення

Дослідження специфічної активності ГЕЛГВ починали з вивчення протизапальної дії. Результати досліджень, наведені в табл. 1, свідчать, що найбільш виражений противиразковий ефект виявив ГЕЛГВ у дозах 1 мг/кг і 5 мг/кг, який не поступається активності препарату порівняння ортофену. При збільшенні дози екстракту противиразкова активність зменшувалась, проте достовірно відрізнялась від контрольної групи.

Слід відзначити, що оскільки всі дози ГЕЛГВ при вивченні гістамінової моделі запалення показали практично однаковий ефект, доцільним було зупинитись на дозах 1 мг/кг та 5 мг/кг при подальших дослідженнях на моделі карагенінового запалення.

Протизапальну активність на даній моделі визначали за об'ємом набряку лапи тварини і виражали у відсотках. Результати

Протизапальна активність ГЕЛГВ на моделі карагенінового набряку

Умови досліджу	Доза, мг/кг	Величина набряку, ум. од.	Активність відносно контролю, %
Контроль	-	23,0±1,5	-
ГЕЛГВ	1	19,0±2,0	21
	5	17,1±1,7	29
Ортофен	8	16,8±1,8	29,9

Таблиця 2

Вплив ГЕЛГВ на активність АЛаТ і ПОЛ

Таблиця 3

Дози препарату	АЛаТ, ммоль/год/л	% активності	ПОЛ	
			МДА, мкмоль/г	ДК, мкмоль/г
Інтактні тварини	3,2±0,42	-	38,5±2,36	1,9±0,71
Контроль (ССІ4)	4,6±0,10	-	95,7±2,6	3,7±1,20
ГЕЛГВ (1 мг/кг)	3,28±0,13	28	65,2±1,9	1,8±0,50
Силібор (25 мг/кг)	3,26±0,30	29	69,9±2,8	2,0±0,91

дослідження наведені в табл. 2. Як видно з даних дослідження, ГЕЛГВ проявляє виражений антиексудативний ефект у дозах 1,5 мг/кг і не поступається за активністю препарату порівняння ортофену.

Показниками антиоксидантної активності є аланінтрансфераза (АЛаТ) — маркерний фермент цитолізу в сироватці крові і показники перекисного окислення

ліпідів у печінці — малоновий діальдегід (МДА) і дієнові кон'югати (ДК).

В основі молекулярних механізмів пошкодження мембран гепатоцитів лежить утворення мембранотоксичних продуктів вільнорадикальної природи. Виражені також зміни функціонального стану печінки (гіперферментемія амінотрансфераз і лужної фосфатази, активація перекисно-

го окислення ліпідів (ПОЛ), зменшення кількості глікогену та ін.), морфологічні зміни аж до некрозу печінки [1].

Оскільки ГЕЛГВ у попередніх дослідженнях виявив найбільшу і майже однакову протизапальну дію у дозах 1 та 5 мг/кг, антиоксидантну активність вивчали у дозі 1 мг/кг. Результати досліджень наведені в табл. 3.

Як видно з даних таблиці, патологічний процес, викликаний введенням чотирьохлористого вуглецю, характеризується збільшенням активності АЛаТ, накопиченням продуктів окислення ліпідів: ДК і МДА, що свідчить про зниження антиоксидантної активності і порушення цілісності мембран гепатоцитів. ГЕЛГВ у досліджуваній дозі проявляє антиоксидантну і мембраностабілізуючу дію. Це підтверджується відновленням рівня АЛаТ до початкового, а також зниженням кількості МДА і ДК у печінці у порівнянні з нелікованими тваринами. При цьому слід зазначити, що ГЕЛГВ виявляє однакову з силібором протекторну активність.

Як свідчать отримані при вивченні антимікробної активності дані, наведені в табл. 4, ГЕЛГВ виявляє антимікробний ефект відносно всіх використаних тест-штамів, який варіює від 18,3-15,3 відносно культур *S.aureus* і *C.albicans* до 25,2 щодо *P.aeruginosa* у дозі 1 мг/кг і від 17,2-15,5 відносно культур *S.aureus* і *C.albicans* до 23,2 щодо *P.aeruginosa* у дозі 5 мг/кг.

Привертає увагу досить широкий спектр активності ГЕЛГВ відносно грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів, спорутворюючої культури (*B.subtilis*) і культури гриба роду *Candida*. Найбільш виражений ефект ГЕЛГВ виявив відносно культури *P.aeruginosa*. В той же час вода, використана як контроль в умовах експерименту, виявила індиферентний ефект відносно всіх тест-культур.

Вивчення ранозагоюючої активності ГЕЛГВ показало, що площа виразок почала зменшуватися на 5 добу у 3-х групах тварин. У дослідних групах, лікованих ГЕЛГВ

Антимікробна активність ГЕЛГВ

Таблиця 4

Тест-штами	Діаметр зони затримки росту мікроорганізмів, мм	
	ГЕЛГВ	
	1 мг/кг	5 мг/кг
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18,3	17,2
<i>Esherichia coli</i> ATCC 25922	16,3	16,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9022	25,2	23,2
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16,0	16,0
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-652	15,3	15,5

Примітка: 1) в контролі діаметр зони затримки росту мікроорганізмів був менше 10 мм; 2) дані є середніми трьох визначень.

Ранозагоююча активність ГЕЛГВ

Таблиця 5

Строки дослідження (дні)	Контроль	ГЕЛГВ		Олія обліпіхи	
	S ран, мм ²	S ран, мм ²	швидкість загоєння, ум. од.	S ран, мм ²	швидкість загоєння, ум. од.
3	205,0±28,1	202,0±30,1	-	203,5±11,1	
5	202,0±38,2	190,0±43,5	5,9	200,0±40,1	1,4
7	190,0±26,5	160,0±33,4	20,0	180,0±34,5	11,3
9	180,0±25,6	122,0±26,4	39,0	160,0±23,5	21,1
11	165,0±20,1	93,0±23,2*	53,0	131,4±30,5	35,0
14	143,0±19,5	55,0±10,1*	72,0	80,5±21,3*	60,0

Примітка: *p<0,05 відносно контролю

у дозі 1 мг/кг і олією обліпихи, регенерація тканин відбувалася значно інтенсивніше ніж у контрольній. При цьому в групі тварин, лікованих ГЕЛГВ, репаративна активність була більш вираженою в порівнянні з групою тварин, які отримували обліпихову олію. Так на 9-у добу у тварин, що отримували ГЕЛГВ, репара-

тивна активність була 32%, а у тварин, що отримували олію обліпихи, — 11%. Отримані дані, наведені в табл. 5, свідчать про виражений ранозагоючий ефект ГЕЛГВ, що переважає за активністю препарат порівняння.

ВИСНОВКИ

1. При проведенні фармакологічних досліджень ГЕЛГВ була

виявлена протизапальна, ранозагоюча, антимікробна, антиоксидантна активність препарату.

2. На підставі проведених досліджень ГЕЛГВ можна рекомендувати як перспективну субстанцію для виробництва препаратів, призначених для лікування запальних та інфекційних захворювань.

ЛІТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. — М.: Наука, 1972. — 252 с.
2. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. — М.: Медицина, 1974. — С. 14.
3. Захаревский А.С. Влияние нестероидных производных индола на нервную систему: Дис. ... канд. мед. наук. — Мн., 1962. — 148 с.
4. Калинин Н.Ф., Волянский Ю.Л., Старобимец З.Г. и др. Определение активности антибактериальных средств наружного применения для лечения гнойно-воспалительных инфекций: Метод. реком. — Х., 1991. — 16 с.
5. Костюк В.А. //Биохимия. — 1991. — Т. 56, вып. 10. — С. 1878-1885.
6. Методические рекомендации по экспериментальному доклиническому изучению фармакологических веществ, предлагаемых в качестве НПВС. ФК МЗУ. — К., 1994. — 40 с.
7. Петровська Л.С., Сіра Л.М., Кисельова Н.П., Зінченко А.А. //Фізіологічно активні речовини. — 1999. — №2(28). — С. 122-125.
8. Савченко Л.Г., Набока О.И., Петровская Л.С., Киселева Н.П. Изучение противовоспалительной активности жидкого экстракта из листа ореха грецкого. Лекарства — человеку: Сб. научн. тр. — М., 1998. — Т. VII. — С. 202-204.
9. Стрела Т.Е. Орех грецкий: Справочное пособие. — К.: Наукова думка, 1991. — 255 с.
10. Сябаев Р.Д., Машковский М.Д., Шварц Г.Я. и др. //Хим.-фарм. журн. — 1986. — №1. — С. 33-39.
11. Тринус Ф.П., Мохорт Н.А. и др. Методы скрининга фармакологического изучения противовоспалительных, анальгетических и ранозаживляющих веществ: Метод. реком. — К., 1974. — С. 4.
12. Akbar S. //Hamdard. — 1996. — Vol. 29, №3. — P. 81-85.
13. Rohnel H.G., Gugler R. //Amer. J. Med. — 1996. — Vol. 81. — P. 13-16.
14. Rutgeerts D. //J. Clin. Gastroenterol. — 1997. — Vol. 9. — P. 314-316.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (0572) 43-19-36.
Національна фармацевтична академія України

Надійшла до редакції 05.02.2001 р.