

ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОТРОПНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРЕПАРАТУ ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВОЇ У ФОРМІ ЖЕЛЕ

У дослідженнях на статевонезрілих щурах з нормальним імунним статусом встановлено виражені імуностимулювальні властивості рослинного желе. Визначено найбільш ефективну дозу лікарського засобу, при застосуванні якої препарат активує клітинну та гуморальну ланки імунітету. За умов імунодефіциту доведено імунокоригувальну дію препарату. Результати доклінічних випробувань свідчать про перспективність подальших досліджень з метою створення засобу для корекції імунного статусу в дітей.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: імунотропні властивості, ехінацея пурпурова, желе.

ВСТУП. Зростання темпів науково-технічного прогресу, погіршення екологічної ситуації, підвищення напруженості життя та посилення дії факторів, що чинять патогенний вплив на імунітет (стреси, СНІД, наслідки аварії на ЧАЕС), визначають проблему фармакологічної корекції імунологічної реактивності зростаючого організму як одну з найбільш важливих і актуальних для вітчизняної педіатрії [5, 11].

На жаль, номенклатуру сучасних імуномодулювальних препаратів складають перш за все синтетичні засоби, на фоні застосування яких імовірно надмірно втручання у функцію імунної системи і, як наслідок, виснаження останньої.

У площині окресленої проблеми особливий інтерес викликають препарати рослинного походження, які вигідно відрізняються від синтетичних аналогів біологічною спорідненістю до тканин організму, м'якою дією та низькою токсичністю [3].

В останні роки пильну увагу фітохіміків, фармакологів і технологів привертає ехінацея пурпурова як перспективне джерело для створення нових імуномодулюючих засобів, що підтверджується наявністю на фармацевтичному ринку України досить широкого асортименту препаратів на основі лікарської рослини як вітчизняного, так і закордонного виробництва. Однак більшість лікарських засобів представлена спиртовмісними ліками, застосування яких обмежене в окремих пацієнтів, що зумовлює доцільність розробки імуно-

тропних засобів, перш за все для педіатрії, на основі рослин роду Echinacea, зокрема ехінацеї пурпурової [16].

У ході проведених раніше досліджень розроблено оригінальну дитячу лікарську форму – желе та встановлено оптимальний склад нового препарату ехінацеї пурпурової [8, 10].

Метою даної роботи було визначити ефективність імунотропного препарату у формі желе, створеного на основі екстракту ехінацеї пурпурової та пектину.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на статевонезрілих нелінійних щурах віком 1 місяць, що є оптимальним для вивчення ліків, призначених для використання в педіатрії, дотримуючись правил роботи з лабораторними тваринами відповідно до існуючих вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [2, 12].

Імунодефіцит у статевонезрілих щурів моделювали шляхом внутрішньочеревного однократного введення гідрокортизону ацетату (Hydrocortison-Richter, Будапешт–Угорщина) у дозі 250 мг/кг [14].

Тварин поділили на групи: інтактну, контрольну (тварини, які внутрішньошлунково отримували воду очищену), референтну (тварини, яким перорально з профілактичною метою вводили настойку ехінацеї в дозі 1,0 мл/кг протягом 2-х тижнів), дослідну (тварини, які за аналогічною схемою отримували желе з ехінацеєю в дозах 1,0; 1,5 і 2,0 г/кг).

© Л. В. Яковлева, О. Д. Немятих, О. Ю. Кошова, 2012.

Характер впливу потенційного лікарського засобу на функціональну активність гуморальної ланки імунітету в щурят з нормальним імунним статусом оцінювали за рівнем гемаглютининів (ГА) у сироватці крові та кількістю антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці. Щурят імунізували тимусозалежним антигеном, а саме еритроцитами барана (ЕБ, 3 % розчин у дозі 1 мл/100 г маси щурят внутрішньочеревно одноразово). На 5-ту добу після імунізації визначали титри гемаглютининів у сироватці крові експериментальних тварин методом серійних розведень у полістиролових планшетах [1, 4].

Кількість АУК у селезінці щурят визначали за допомогою методу локального гемолізу в гелі, що оснований на здатності лімфоїдних клітин експериментальних тварин, які імунізовані чужорідними еритроцитами, виділяти антиеритроцитарні антитіла, що викликають лізис еритроцитів за присутності комплементу. За числом макроскопічно видимих зон гемолізу навколо антитілоутворюючих клітин підраховували кількість продуцентів антитіл на лімфоїдний орган [15].

Вплив желе на неспецифічну резистентність організму оцінювали в тесті фагоцитарної активності нейтрофілів (ФАН) крові з латексом за фагоцитарним індексом (Fi), що відображає відсоток фагоцитуючих нейтрофілів, фагоцитарним числом (Fu), яке вказує на середню кількість часточок латексу, що поглинуті одним нейтрофілом, та індексом фагоцитарної активності (IFA), який є добутком фагоцитарного індексу на фагоцитарне число [6].

При визначенні рівня реалізації імунотропних властивостей оригінального лікарського засобу на тлі імунодефіциту препарат вводили за 5 діб до відтворення модельованої патології та протягом всього періоду експерименту до дня визначення показників імунної відповіді. Загальний термін введення склав 11 діб. Імунізацію тварин проводили за вищенаведеною схемою через добу після введення гідрокортизону ацетату (ГК). Для оцінки визначення

ступеня імунодефіциту на 5-ту добу після імунізації визначали титри ГА та масові коефіцієнти (МК) органів імуногенезу (тимуса і селезінки).

Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакета статистичних програм "Statistica 6,0". Для отримання статистичних висновків застосовували непараметричний критерій Манна-Уїтні та параметричний метод Ньюмана-Кейлса. При порівнянні статистичних виборок було взято рівень значущості $p < 0,05$ [7, 9, 13].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження впливу желе з ехінацеєю на гуморальну ланку імунітету статевонезрілих щурів з нормальним імунним статусом виявило, що введення препарату ехінацеї реалізується підвищенням титрів гемаглютининів у сироватці крові. Останнє вказує на імуностимулювальні властивості препарату. Виражену здатність підсилювати утворення антитіл желе реалізує в дозі 2,0 г/кг, достовірно збільшуючи титри у сироватці імунізованих тварин (табл. 1).

Вивчення насиченості селезінки клітинами показало, що під впливом досліджуваного лікарського засобу, введеного в розроблених режимах дозування, відбувається збільшення кількості спленоцитів на 16 %, що може свідчити про активацію продукції імунокомпетентних клітин у дослідній групі порівняно з інтактними щурятами. При цьому звертає на себе увагу негативна кореляція в референтній та дослідній серіях експериментів.

Порівняльний аналіз фагоцитарної активності нейтрофілів крові як одного з ключових показників функціонального стану імунної системи виявив, що введення лікарського засобу, розробленого на основі комбінації рослинних біологічно активних речовин, у дозах 1,5 та 2,0 г/кг протягом 2-х тижнів сприяє достовірному підвищенню фагоцитарного індексу та фагоцитарного числа і реалізується збільшенням індексів IFA на 17 та 29 % порівняно з інтактною серією дослідів. При цьому референтний препарат проявляє помірну тен-

Таблиця 1 – Вплив желе з ехінацеєю на гуморальний імунітет щурят

Група тварин	Доза	Титри ГА, Log_2 (Me (LQ; UpQ))	АУК на селезінку
Інтактна	–	13 (13; 13)	18022±1404
Референтна	1,0 мл/кг	13 (13; 13)	15678±957*
Дослідна	1,0 г/кг	13 (13;14)	18196±1356**
	1,5 г/кг	13 (13;17)	20924±1355**
	2,0 г/кг	19,8 (19; 20)*/**	20930±1342**

Примітка. Тут і в таблиці 2: * – різниця вірогідна порівняно з групою інтактних тварин; ** – різниця вірогідна порівняно з референтною групою тварин.

денцію до підвищення F_i та F_u , що віддзеркалюється достовірним зростанням значень інтегрального показника на 26 % (табл. 2).

Отже, результати даної серії дослідів дають підстави стверджувати, що досліджуваний лікарський засіб оригінального складу на високому рівні реалізує здатність стимулювати гуморальну та клітинну ланки імунітету в здорових тварин.

Дані щодо імуноотропної дії препарату рослинного походження в щурят з імунодефіцитом наведено в таблицях 3 та 4. Отримані результати свідчать про те, що введення гідрокортизону ацетату тваринам контрольної групи

проявляється розвитком патологічного стану, що віддзеркалюється достовірним зниженням титрів ГА та супроводжується чіткою тенденцією до зменшення МК селезінки і тимуса. Останнє є вельми закономірним результатом цитотоксичної дії великих доз гідрокортизону [3].

Профілактичне ж введення лікарського засобу, розробленого на основі комбінації рослинних біологічно активних речовин, сприяє відновленню імунореактивності у тварин. Ефективність оригінального препарату в розрізі антитілогенезу проявляється збереженням титрів ГА відносно рівня щурят інтактною групи. При цьому збільшення дози желе з

Таблиця 2 – Вплив желе з ехінацеєю на фагоцитарну активність нейтрофілів крові щурят з нормальним імунним статусом

Група тварин	Доза	Показник			
		F_i	F_u	IFA	
		Median (Q25–Q75)		Mean±St.er.	A, %
Інтактна	–	69,5 (63–73)	2,86 (2,61–3,38)	209,33±9,22	–
Референтна	1,0 мл/кг	86,5 (70–91)*	3,13 (2,88–3,43)	264,17±9,22*	26,2
Дослідна	1,5 г/кг	85,5 (84–87)*	2,93 (2,88–2,95)*	245,50±7,31*	17,3
	2,0 г/кг	87,0 (75,0–88,0)	3,10 (2,78–3,73)*/**	270,00±24,32*/**	29,0

Таблиця 3 – Вплив желе з ехінацеєю на титри ГА в сироватці крові щурят з імунодефіцитом

Група тварин	Доза	Титри ГА, Log_2 (Me (Q25–Q75))
1-ша серія		
Інтактна	–	8 (6; 9)
Контрольна	–	4 (3; 5)*
Референтна	1,0 мл/кг	6 (5; 7)*/**
Дослідна	1,5 г/кг	6 (5,5; 7,5)**
2-га серія		
Інтактна	–	13,5 (12; 13)
Контрольна	–	9 (9; 10)*
Референтна	1,0 мл/кг	13 (10; 13)**
Дослідна	2,0 г/кг	14 (10; 14)**

Примітка. Тут і в таблиці 4: * – різниця вірогідна порівняно з групою інтактних тварин; ** – різниця вірогідна порівняно з контрольною групою тварин.

Таблиця 4 – Динаміка масових коефіцієнтів органів імуногенезу щурят з імунодефіцитом

Група тварин	Доза	Масові коефіцієнти	
		селезінки	тимуса
1-ша серія			
Інтактна	–	0,70±0,09	0,26±0,01
Контрольна	–	0,35±0,05*	0,05±0,01*
Референтна	1,0 мл/кг	0,41±0,06*	0,07±0,01*
Дослідна	1,5 г/кг	0,49±0,10*	0,10±0,01*/**
2-га серія			
Інтактна	–	0,93±0,07	0,36±0,01
Контрольна	–	0,52±0,05	0,10±0,02*
Референтна	1,0 мл/кг	0,67±0,12	0,18±0,04*/**
Дослідна	2,0 г/кг	0,67±0,12	0,22±0,02*/**

ехінацією до 2 г/кг позитивно впливає на значення оцінюваного показника за досліджуваних умов експерименту.

Слід зазначити, що під впливом препарату відзначається також попередження змін у МК селезінки і тимуса. Так, на фоні застосування желе у дозі 1,5 г/кг значення коефіцієнтів, порівняно з контролем, відновлюються на 40 та 50 %, а при збільшенні дози – в 1,3 та 2,2 раза, відповідно.

Таким чином, аналіз отриманих даних дозволяє констатувати, що застосування желе з комплексом біологічно активних речовин ехінацеї пурпурової та пектину реалізується підсиленням імунної відповіді як у здорових тварин, так і в щурят за умов імунодефіциту.

ВИСНОВКИ. 1. Результати проведених досліджень свідчать про виражену імуностимулювальну дію желе з ехінацією за умов профілактичного застосування у статевонезрілих щурів з нормальним імунним статусом. Найбільшу активність потенційний лікарський засіб реалізує в дозі 2 г/кг.

2. На експериментальній моделі імунодефіциту в щурят рослинне желе проявляє імунокоригувальні властивості шляхом попередження змін у масових коефіцієнтах тимуса і селезінки, а також через відновлення антитілогенезу.

3. Все вищезазначене підкреслює перспективність подальших досліджень з метою створення імуотропного лікарського засобу природного походження для педіатрії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вивчення імуноксичної дії лікарських засобів / [Г. М. Бутенко, О. П. Терешіна, Ю. М. Максимов та ін.] // Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С. 102–114.
2. Доклінічне вивчення нешкідливості лікарських засобів, призначених для застосування в педіатрії : методичні рекомендації / [М. Ф. Денисова, Н. С. Нікітіна, І. П. Дзюба та ін.]. – К., 2002. – 27 с.
3. Дранник Г. М. Імуотропні препарати / Г. М. Дранник, Ю. Я. Гриневич, Г. М. Дизик. – К. : Здоров'я, 1994. – 288 с.
4. Иммунологические методы / под ред. Х. Фриделя. – М. : Медицина, 1987. – 472 с.
5. Клиническая иммунология : учебник для студентов медицинских вузов / под ред. А. В. Караулова. – М. : Медицинское информационное агентство, 1999. – 604 с.
6. Лабораторные методы оценки иммунного статуса // Справочник медицинской и лабораторной технологии и диагностики / под ред. А. И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 1999. – Т. 2.
7. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2001. – 320 с.
8. Надлежащая производственная практика лекарственных средств / под ред. Н. А. Ляпунова, В. А. Загоря, В. П. Георгиевского, Е. П. Безуглой. – К. : Морион, 1999. – С. 508–545.
9. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М. : Ремедиум, 2000. – С. 349–354.
10. Пат. України на корисну модель № 53209, МПК А61К 36/00. Лікувально-профілактичний засіб на основі ехінацеї у формі желе / Дмитрієвський Д. І., Немятих О. Д. – Заявл. 16.04.10 ; опубл. 27.09.10, Бюл № 18.
11. Петров Р. В. Иммунология / Р. В. Петров. – М. : Медицина, 1983. – 368 с.
12. Фармакологическое изучение возрастных особенностей в действии лекарственных средств, предлагаемых для клинического изучения в педиатрической практике : методические рекомендации / [И. В. Маркова, В. А. Гусель, Н. И. Западнюк и др.]. – М., 1988. – 77 с.
13. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных : учебник / А. А. Халафян. – 3-е изд. – М. : ООО "Бином-Пресс", 2007. – 512 с.
14. Швец В. Н. Органы кроветворения мышей после однократного введения гидрокортизона / В. Н. Швец, В. В. Португалов // Бюл. эксперим. биологии. – 1979. – № 1. – С. 12–16.
15. Ierne K. N. Plaque formation by single antibody – producing cells / K. N. Ierne, A. A. Nordin // Science. – 1963. – **140**. – P. 405–406.
16. Tierra M. Echinacea: an effective alternative to antibiotics / M. Tierra // J. Herb. Pharmacother. – 2007. – **7**, № 2. – P. 79–89.

Л. В. Яковлева, О. Д. Немятых, Е. Ю. Кошова
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ
ЛУГАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА ЭХИНАЦЕИ ПУРПУРНОЙ В ФОРМЕ ЖЕЛЕ

Резюме

В исследованиях на неполовозрелых крысах с нормальным иммунным истатусом установлены выраженные иммуностимулирующие свойства растительного желе. Определена наиболее эффективная доза лекарственного средства, при применении которой препарат активирует клеточное и гуморальное звенья иммунитета. В условиях иммунодефицита доказано иммунокорригирующее действие препарата. Результаты доклинических испытаний свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований с целью создания средства для коррекции иммунного статуса у детей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **иммунотропные свойства, эхинацея пурпурная, желе.**

L. V. Yakovlieva, O. D. Nemyatykh, O. Yu. Koshova
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV
LUHANSK STATE MEDICAL UNIVERSITY

RESEARCH OF IMMUNOTROPIC PROPERTIES OF ECHINACEA PURPUREA DRUG IN JELLY FORM

Summary

By researches on immature rats with normal immune status there were determined expressed immune stimulating properties of herbal jelly. The most effective dose of drug was detected, at application of which this drug activates the cellular and humorous links of immunity. In the conditions of immunodeficit the immunocorrection action of drug was well-proven. Results of preclinical trial indicate the pharmacological efficiency of jelly and perspectives of further researches aimed at creation of drug for the correction of immune status in children.

KEY WORDS: **immunotropic properties, echinacea purpurea, jelly.**

Отримано 19.09.11

Адреса для листування: О. Д. Немятих, Луганський державний медичний університет, кв. 50-річчя Оборони Луганська, 1г, Луганськ, 91045, Україна.