

Рекомендована д. фармац. наук, проф. С. М. Марчишин

УДК 615.453:582.998-06:616-097]-092.9

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КОМБІНОВАНИХ ТАБЛЕТОК ТА СУБСТАНЦІЇ ЕКСТРАКТУ КОРЕНЯ ЕХІНАЦЕЇ НА ПОКАЗНИКИ ІМУННОЇ СИСТЕМИ

©І. М. Кліщ, С. М. Дрогвоз¹, В. М. Коваль

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

¹Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: проведено дослідження впливу комбінованих таблеток, до складу яких входить екстракт з кореня ехінацеї, аскорбінова кислота і цинку аспарагінат на показники імунної системи щурів та мишей з нормальним імунним статусом. У результаті проведеного дослідження встановлено виражені імуностимулювальні властивості досліджуваних таблеток при порівнянні їх із субстанцією екстракту з кореня ехінацеї. Встановлено здатність дослідних зразків підвищувати антитілогенез, фагоцитарну активність нейтрофілів і пригнічувати розвиток реакції гіперчутливості повільного типу.

Ключові слова: комбіновані таблетки, екстракт з кореня ехінацеї, аскорбінова кислота, цинку аспарагінат, показники імунної системи, імунний статус.

Вступ. Однією з найважливіших складових здоров'я людини є збереження на необхідному рівні імунологічного захисту, який, поряд із нервовою та гормональною системами, забезпечує нормальне функціонування організму.

Початок XXI століття охарактеризувався широким поширенням різних імунодефіцитних захворювань. За сучасними уявленнями імунодефіцитні стани – це такий функціональний стан імунної системи, при якому спостерігають зниження її активності. Імунодефіцити розвиваються в разі несприятливих факторів зовнішнього середовища (радіація, електромагнітні випромінювання), неправильного та нераціонального харчування, незбалансованого складу їжі, забрудненого повітря, несприятливої екологічної ситуації. Крім факторів зовнішнього середовища, на розвиток імунодефіцитів впливає тривалий прийом лікарських препаратів, таких, як глюкокортикостероїди, нестероїдні протизапальні засоби, цитостатики та багато інших. На несприятливий фон імунодефіциту нашаровуються різні інфекції, які ще сильніше послаблюють імунну систему.

Сьогодні на світовому ринку фармпрепаратів частка засобів рослинного походження становить більше 40 %, причому в останні роки з'явилася тенденція до її збільшення. За прогнозами Всесвітньої організації охорони здоров'я, протягом найближчих десяти років частка фітопрепаратів в загальному обсязі лікарських засобів складе більше 60 %.

Номенклатуру сучасних імуностимулюючих препаратів складають, перш за все, синтетичні засоби, при застосуванні яких можливе надмірно активне втручання в функцію імунної сис-

теми, що може призвести до її виснаження. Отже, існує проблема створення імуномодулюючих фітопрепаратів, що виявляють більш м'яку та природню дію на організм людини [2, 3].

Ехінацея має широкий спектр фармакологічних властивостей. Препарати ехінацеї сприяють підвищенню фагоцитарної активності нейтрофілів та макрофагів, стимулюють синтез інтерлейкіну-1 і трансформацію В-лімфоцитів у плазматичні клітини, покращують функції Т-хелперів, нормалізують процеси обміну речовин, стимулюють діяльність центральної нервової системи, мають антибактеріальні, противірусні та протизапальні властивості [1, 2, 4, 5].

Більшість досліджень свідчать, що для ехінацеї притаманні, перш за все, неспецифічні імуномодулюючі властивості, які реалізуються через стимуляцію клітин імунної системи [6, 7].

Корінь ехінацеї містить глікозиди (ехінокозид), бетаїн, органічні кислоти, ефірну олію, мінеральні речовини (K, Mg, Fe, Al, Se), вітаміни. Галенові препарати стимулюють Т-систему імунітету, підвищують першу фазу захисту, тобто стимулюють неспецифічний імунітет і фагоцитоз, діяльність макрофагів та нейтрофілів, посилюють бактерицидну активність клітин. Пізніше включається специфічний імунний захист, підвищується кількість Т-лімфоцитів та продукція цитокінів. Препарати ехінацеї мають противірусну дію, пригнічують активність гіалуронидази, яку продукують мікроорганізми та віруси.

Клінічні дослідження показують, що препарати ехінацеї позитивно діють при лімфолейкозі, що може мати перспективу при протипухлинному захисті. Галенові препарати ехінацеї мають стимулюючу дію на центральну нервову систему,

посилюють сексуальну потенцію, сприяють загоюванню ран, підвищують захисні сили організму (імунітет). Застосовують при запальних процесах внутрішніх органів, виснаженнях організму, інфекційних захворюваннях, статевій слабкості у чоловіків (імпотенції), при виразках, опіках [8].

Аскорбінова кислота та цинк стимулюють розмноження білих кров'яних клітин, що є одним з елементів протипухлинного захисту організму, а також сприяє підвищенню активності нейтрофілів, Т-лімфоцитів і протипухлинних клітин-кілерів. Крім того, цинк необхідний для секреції тимуліну – основного гормону тимусу, в якому здійснюється утворення імунокомпетентних клітин.

Зважаючи на це, ми поставили собі за мету вивчити вплив комбінованих таблеток, що містять екстракт з кореня ехінацеї, аскорбінову кислоту і цинку ацетат на показники імунної системи щурів та мишей з нормальним імунним статусом та порівняти їх із субстанцією екстракту з кореня ехінацеї.

Методи дослідження. Об'єктом дослідження слугували комбіновані таблетки, до складу яких входить екстракт з кореня ехінацеї 100 мг, аскорбінова кислота 300 мг, цинку аспарагінат 25 мг та субстанція екстракту з кореня ехінацеї.

Імунотропні властивості досліджуваного зразка, порівняно з субстанцією екстракту з кореня ехінацеї, оцінювали за здатністю впливати на фагоцитарну активність поліморфноядерних лейкоцитів, антитілоутворення, спроможності пригнічення розвитку реакції гіперчутливості повільного типу на щурах і мишах з нормальним імунітетом.

При розрахунку дози складових компонентів комбінованих таблеток використовували перерахунок з урахуванням коефіцієнтів видової чутливості за поверхнею тіла та того факту, що на сьогодні в медичній практиці препарати з ехінацеєю використовують у клінічній практиці в дозі 200 мг на добу для дорослих. Таким чином, в результаті перерахунку були отримані дози: для субстанції з екстракту з кореня ехінацеї (ЕКЕ) для щурів – 20 мг/кг та мишей – 40 мг/кг. Для комбінованих таблеток, які будуть застосовувати 1 раз на добу, умовно терапевтичну дозу для лабораторних тварин визначали за сумарним вмістом активних речовин (екстракт з кореня ехінацеї – 100 мг/таблетка, кислоти аскорбінової 300 мг/табл. та цинку аспарагінату – 25 мг/табл., всього: 425 мг/таблетку), яка становить для щурів – 37 мг/кг та мишей – 74 мг/кг, але якщо визначати цю дозу за вмістом екстракту з кореня ехінацеї, то вона складає для щурів – 10 мг/кг та мишей – 20 мг/кг [9].

На першому етапі вивчали вплив досліджуваних зразків на неспецифічну резистентність

організму статевозрілих щурів самиць масою 180–200 г за впливом на фагоцитарну активність нейтрофілів крові [10, 11].

Тварин рандомізували на 3 експериментальні групи:

1 група – інтактні тварини, які не зазнавали будь-якому впливу;

2 група – тварини, яким вводили комбіновані таблетки;

3 група – тварини, яким вводили субстанцію ЕКЕ.

Досліджувані зразки вводили протягом двох тижнів внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда з розрахунку 5 мл/кг у вигляді суспензії.

Для оцінки виразності фагоцитарної активності нейтрофілів розраховували такі показники: відсоток нейтрофілів, які фагоцитували (F_i – фагоцитарний індекс), середню кількість часточок латексу, що поглинуто одним нейтрофілом (F_u – фагоцитарне число) та інтегральний показник – індекс фагоцитарної активності (ІФА – добуток фагоцитарного індексу на фагоцитарне число).

Метою другого етапу дослідження стало визначення впливу комбінованих таблеток та субстанції ЕКЕ на показники гуморальної та клітинної ланок імунітету статевозрілих мишей, яке проводили відповідно до методичних рекомендацій [12].

Характер впливу досліджуваних зразків на функціональну активність В-системи оцінювали за рівнем гемаглютинінів у сироватці крові мишей. Для цього мишей імунізували тимусзалежним антигеном еритроцитами барана (ЕБ): 3% розчин у дозі 0,2 мл/20 г маси мишей внутрішньоочеревинно, одноразово. На 5-ту добу після імунізації визначали титри гемаглютинінів (ГА) у сироватці крові експериментальних тварин методом серійних розведень у полістиролових планшетах. Реакція аглютинації ґрунтується на здатності антитіл (аглютинінів), які містяться в сироватці крові імунізованих тварин, склеювати в ізотонічному розчині хлористого натрію еритроцити барана [4, 13].

Стан клітинного імунітету на тлі введення досліджуваних зразків визначали за реакцією гіперчутливості повільного типу (ГПТ) за методом К. Р. Kitamura [4, 14]. Реакція націлена на визначення здатності досліджуваного об'єкта впливати на продукцію сенсibilізованими Т-ефекторами медіаторів, які викликають інфільтрацію тканини клітинними елементами. Введення антигену у подушечку лапки тварини призводить до розвитку локального набряку.

Використовували такі групи:

1 група – неімунізований контроль;

2 група – імунізований контроль;

3 група – тварини, яким вводили комбіновані таблетки;

4 група – тварини, яким вводили субстанцію ЕКЕ.

Досліджувані зразки вводили протягом двох тижнів до імунізації та протягом наступних 5 діб внутрішньошлунково за допомогою металевого зонда з розрахунку 1 мл/кг у вигляді суспензії.

Тварин імунізували однократним внутрішньоочеревинним уведенням суспензії свіжовідмитих ЕБ в дозі $2 \cdot 10^5$ клітин в об'ємі 0,5 мл фізіологічного розчину натрію хлориду на 20 г маси тіла. На 5-ту добу для виявлення імунізації мишам під апоневротичну пластинку однієї з задніх кінцівок (дослідна лапа) вводили завершальну дозу антигену, що склала 10^8 еритроцитів барана, в об'ємі 0,02 мл на тварину. У контролateralну лапу (контрольна лапа) вводили фізіологічний розчин у такому ж об'ємі. Через 24 год тварин виводили з експерименту передозуванням ефірного наркозу, відрізали стопи задніх кінцівок тварин на рівні надступаковогомілкового суглоба, зважували їх.

Виразність місцевої реакції оцінювали за співвідношенням величини маси стоп дослідної і контрольної лап у кожній групі тварин. Індекс реакції (IP) розраховували за формулою (1):

$$IP = \frac{M_{д. лапи} - M_{к. лапи}}{M_{к. лапи}} \times 100\% \quad (1),$$

де $M_{д. лапи}$ – маса дослідної лапи; $M_{к. лапи}$ – маса контрольної лапи.

Таблиця 1. Вплив комбінованих таблеток порівняно з субстанцією ЕКЕ на фагоцитарну активність нейтрофілів крові щурів (n=8)

Групи тварин	Показники		
	фагоцитарний індекс (Fi)	фагоцитарне число (Fu)	IFA
	<i>Me (LQ; UQ)</i>		<i>M ± m</i>
Інтактний контроль	12,5 (10,5; 16,0)	1,88 (1,72; 2,17)	28,5±4,8
Комбіновані таблетки	18,5 (15,5; 26,5)	2,61 (2,21; 3,01)*	43,0±6,3
Субстанція ЕКЕ	14,5 (10,5; 24,5)	2,62 (2,38; 2,74)*	46,9±7,3

Примітка. * – відмінності достовірні щодо значень тварин з групи інтактного контролю, $p < 0,05$.

ним імунним статусом комбінованих таблеток в дозі 37 мг/кг та субстанції ЕКЕ в дозі 20 мг/кг протягом 2 тижнів сприяло тенденційному підвищенню фагоцитарного індексу у 1,5 раза та 1,2 раза відповідно. Це свідчить про перевагу комбінованих таблеток над субстанцією ЕКЕ в 1,3 раза, достовірному відносно групи інтактного контролю зростанню у 1,38 і 1,39 раза відповідно фагоцитарного числа. Ці зміни позначились на індексі фагоцитарної активності, яке тенденційно відносно групи інтактного контролю зросло у групі комбінованих таблеток – у 1,5 раза, а у групі субстанції ЕКЕ – у 1,6 раза (табл. 1).

Таким чином, за результатами проведеного дослідження встановлено здатність комбінова-

Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакета статистичних програм «Statistica 6,0». Для отримання статистичних висновків застосовували критерій Манна-Уїтні (для даних, які не підлягають нормальному закону розподілення) та параметричні методи (метод Н'юмана-Кейлса) [15, 16, 17]. При порівнянні статистичних вибірок прийнято рівень значущості $p < 0,05$.

Під час експерименту тварини знаходилися у віварії при $t \cdot 18-24$ °С, вологості 50–60 %, природному світловому режимі “день-ніч”, у пластикових клітках, на збалансованому харчовому раціоні відповідно до діючих норм. Дослідження проведено з дотриманням правил “Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей” (Страсбург, 1986 р.) [18, 19].

Результати й обговорення. Експериментальні дослідження свідчать про те, що для засобів на основі ехінацеї пурпурної притаманні виразні властивості стимулювати фагоцитарну активність нейтрофілів, макрофагів, підвищуючи, таким чином, неспецифічний імунітет. Зважаючи на це було доцільним вивчити вплив комбінованих таблеток та субстанції ЕКЕ на фагоцитарну активність нейтрофілів щурів з нормальним імунним статусом. Результати наведено в таблиці 1.

Аналіз отриманих результатів, наведених в таблиці 1, свідчить, що введення щурам з нормаль-

них таблеток та субстанції ЕКЕ активізувати неспецифічний імунітет шляхом стимулювання фагоцитарної активності нейтрофілів та перевага комбінованих таблеток над монокомпонентом субстанцією ЕКЕ у 1,3 раза. Цю перевагу можна пояснити синергічною взаємодією таких компонентів комбінованих таблеток, як кислота аскорбінова та цинку аспарагінат, які потенціюють дію екстракту з кореня ехінацеї.

Наступним етапом роботи стало дослідження впливу комбінованих таблеток та субстанції ЕКЕ на гуморальну ланку імунітету – процесу антитілоутворення за показниками титрів гемаглютининів у сироватці крові мишей. Результати наведено у таблиці 2.

Таблиця 2. Вплив комбінованих таблеток порівняно з субстанцією ЕКЕ на первинну імунну відповідь мишей (n=8)

Групи тварин	Показники	
	титри ГА	
	<i>Me (LQ; UQ)</i>	A %
Інтактний контроль	5,0 (4,0; 5,5)	-
Комбіновані таблетки	6,5 (6,0; 7,0) *	30
Субстанція ЕКЕ	6,0 (6,0; 6,5) *	20

Примітки: 1) * – відмінності достовірні щодо значень тварин з групи інтактного контролю, $p < 0,05$; 2) А, % розраховували відносно даних інтактного контролю.

Дані таблиці 2 свідчать про імуностимулювальні властивості досліджуваних об'єктів. За активністю стимулювати утворення антитіл встановлено достовірні відмінності відносно групи інтактного контролю у тварин групи комбінованих таблеток 30 %, а групи субстанції ЕКЕ – 20 %. Перевага комбінованих таблеток відносно субстанції ЕКЕ склала 10 % (табл. 2), що свідчить на користь комбінованих таблеток, в якій діючі речовини аскорбінова кислота та цинку аспарагіат потенціюють дію ЕКЕ, та відображає їх значущу імуностимулювальну активність незва-

жаючи на меншу в 2 рази дозу ЕКЕ в складі таблеток (доза субстанції ЕКЕ – 40 мг/кг, доза комбінованих таблеток: за сумою активних речовин – 74 мг/кг, за ЕКЕ – 20 мг/кг).

Наступним етапом роботи стало дослідження впливу комбінованих таблеток та субстанції ЕКЕ на клітинну ланку імунітету за допомогою реакції гіперчутливості повільного типу у мишей. Результати наведено у таблиці 3.

Встановлено здатність досліджуваних зразків пригнічувати розвиток імунної запальної реакції, на що вказують достовірне зменшення значен-

Таблиця 3. Вплив комбінованих таблеток порівняно з субстанцією ЕКЕ на розвиток реакції ГПТ у мишей, n=8

Групи тварин	Індекс реакції ГПТ <i>Me (LQ; UQ)</i>
Неімунізований контроль	0,72 (0,33; 1,14)
Імунізований контроль	3,49 (2,66; 7,05)*
Комбіновані таблетки	1,77 (0,81; 2,90)**
Субстанція ЕКЕ	2,68 (1,16; 6,30)**

Примітки: 1) * – відмінності достовірні щодо значень тварин з групи неімунізованого контролю, $p < 0,05$; 2) ** – відмінності достовірні щодо значень тварин з групи імунізованого контролю, $p < 0,05$.

ня відповідного індексу реакції ГПТ (табл. 3). Так, комбіновані таблетки достовірно відносно групи імунізованого контролю сприяли зниженню імунної запальної реакції на 49,3 %, а субстанція ЕКЕ вірогідно, порівняно з імунізованим контролем, знижувала імунну запальну реакцію на 23,2 % (табл. 3). Порівняльний аналіз дії комбінованих таблеток та субстанції ЕКЕ показав, що за здатністю пригнічувати імунну запальну реакцію комбіновані таблетки мають перевагу над субстанцією ЕКЕ в 1,5 рази (табл. 3), а враховуючи той факт, що доза ЕКЕ в таблетці в 2 рази нижча за таку субстанції ЕКЕ, ця перевага зростає в 2 рази, тобто – терапевтична активність комбінованих таблеток на цій моделі вища за таку субстанції ЕКЕ в 3 рази. Це вказує на потенціювання ас-

корбіновою кислотою та цинком аспарагіату терапевтичної дії екстракту з кореня ехінацеї.

Висновки. 1. Результати проведеного дослідження дозволили встановити виражені імуностимулювальні властивості комбінованих таблеток, до складу яких входить екстракт з кореня ехінацеї, аскорбінова кислота і цинку аспарагіат, які переважають в середньому на 30 % імуностимулювальну активність монокомпонента субстанції – екстракту з кореня ехінацеї, у лабораторних тварин з нормальним імунним статусом. 2. Встановлено здатність комбінованих таблеток та субстанції екстракту з кореня ехінацеї підвищувати антитілогенез, фагоцитарну активність нейтрофілів та пригнічувати розвиток реакції гіперчутливості повільного типу.

Література

1. Дранник Г. М. Имунотропні препарати / Г. М. Дранник, Ю. Я. Гриневич, Г. М. Дизик. – К. : Здоров'я, 1994. – 288 с.
2. Петров Р. В. Иммунология / Р. В. Петров. – М. :

Медицина, 1983.– 368 с.

3. Клиническая иммунология: учебник для студентов медицинских вузов / под ред. А. В. Караулова.– М. : Медицинское информационное агенство, 1999.– 604 с.

4. Caruso T.J., Gwaltney J.M. Treatment of the common cold with Echinacea: a structured review // Clin. Infect. Dis.– 2005.– Vol. 40.– P. 807–810.
5. Компендиум 2010 – лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К. : Моріон, 2010. – 2240 с.
6. Barrett B. Medicinal properties of Echinacea: a critical review // Phytomedicine.– 2003.– Vol.10.– P. 66–86.
7. Percival S.S. Use of Echinacea in medicine // Biochem. Pharmacol.– 2000.– Vol.60.– P. 155–158.
8. <http://uk.wikipedia.org/wiki>
9. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // Доклады АН СССР. – 1979. – Т. 247, № 6. – С. 1513–1516.
10. Лабораторные методы оценки иммунного статуса // В кн.: Справочник медицинской и лабораторной технологии и диагностики / под ред. А. И. Карпищенко. СПб.: Интермедика, 1999 г.
11. Доклінічні дослідження неспецифічної активності та нешкідливості мінеральних вод / [Бабов К. Д., Громов Л. О., Нікіпелова О. М. та ін.] // Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С. 102–114.
12. Вивчення імуноотоксичної дії лікарських засобів / [Г. М. Бутенко, О. П. Терешіна, Ю. М. Максимов, В. Г. Аркадьєв та ін.] // Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – С. 102–114.
13. Иммунологические методы / под ред. Х. Фримеля. – М. : Медицина, 1987.– 472 с.
14. Kitamura K. A Foodpad weigh assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse // J. Immunol. Methods.– 1980.– V. 39.– P. 277-283.
15. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов // В кн. : Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.– М. : Ремедиум, 2000.– С. 349–354.
16. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных: учебник – 3-е изд. – М.: ООО «Бином-Пресс», 2007.– 512 с.
17. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабищ П. Н. – Вид-во: Моріон.– 320 с.
18. Западнюк М. П. Лабораторные животные. Использование в эксперименте / М. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария. – Киев: Высшая школа, 1983. – 382 с.
19. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Кожем'якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдінова Г. А. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМБИНИРОВАННЫХ ТАБЛЕТОК И СУБСТАНЦИИ ЭКСТРАКТА КОРНЯ ЭХИНАЦЕИ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

И. Н. Клищ, С. М. Дроговоз¹, В. Н. Коваль

Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского

¹Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: проведено исследование влияния комбинированных таблеток, в состав которых входит экстракт корня эхинацеи, аскорбиновая кислота и цинка аспарагинат на показатели иммунной системы крыс и мышей с нормальным иммунным статусом. В результате проведенного исследования установлены выраженные иммуностимулирующие свойства исследуемых таблеток и сравнение их с субстанцией экстракта корня эхинацеи.

Ключевые слова: комбинированные таблетки, экстракт корня эхинацеи, аскорбиновая кислота, цинка аспарагинат, показатели иммунной системы, иммунный статус.

STUDY OF COMBINED TABLETS AND ECHINACEA ROOT EXTRACTS SUBSTANCE IN THE IMMUNITY SYSTEM

I. M. Klishch, S. M. Drohovor¹, V. M. Koval

Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky

¹National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: There was conducted the study of the impact of combined tablets with Echinacea root extract, ascorbic acid and zinc asparaginate to the parameters of immune system of rats and mice with normal immune status. Immunostimulating properties of the investigated tablets and comparing them with the substance of the of Echinacea root extract are expressed as a result of the study.

Key words: combined pill, Echinacea root extract, ascorbic acid, zinc asparaginate, parameters of the immune system, immune status.