

Отримання та вивчення фармакологічної активності поліфенольного комплексу листків скумпії звичайної

І.Л.Бензель, М.М.Козловський, Н.О.Виноград, О.Л.Бензель

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,
Львівський науково-дослідний інститут епідеміології та гігієни МОЗ України
Львів, Україна

Використовуючи оптимальні умови екстракції з листків скумпії звичайної був отриманий ліофілізований фітокомплекс біологічно активних речовин поліфенольної природи. Досліджені його протівірусні, протихламідійні, протирикетсійні та імуностимулюючі властивості.

Ключові слова: фітосубстанція, скумпія звичайна, поліфенольні сполуки, протівірусна дія, протимікробна дія, антитілогенез.

ВСТУП

Пошук перспективних рослинних джерел та створення на їх основі нових ефективних препаратів з широким спектром фармакологічної дії є актуальним і пріоритетним напрямком сучасної фармації.

Використання рослин з лікувальною метою посідає важливе місце в терапії та профілактиці різних захворювань. Численні дані свідчать, що серед величезної кількості лікарських препаратів, які застосовуються в Україні, значну частину займають лікарські засоби на рослинній основі, що зумовлено їх суттєвими перевагами [12]. Серед них найважливішими є висока фармакологічна активність, низька токсичність та значно нижчий ризик виникнення побічних явищ. Не менш важливим фактором є дешевизна і доступність сировинної бази для виробництва фітозасобів. Крім цього різноманітність біологічно активних речовин, які містяться в рослинах, забезпечує широкий спектр їх терапевтичної дії, що є дуже важливим при комплексному лікуванні супутніх захворювань.

Останнім часом в Україні та світі спостерігається значне розповсюдження інфекційних хвороб, зниження чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних лікарських засобів, а також збільшення частоти їх побічних проявів, зокрема алергічних реакцій. З огляду на це пошук і створення нових безпечних та ефективних протівірусних і протимікробних лікарських засобів рослинного походження, а також раціональне та комплексне використання сировини дикорослих і культивованих рослин України є надзвичайно важливими. Однією з таких рослин є скумпія звичайна (*Cotinus coggygria* Scop.) родини Сумахові (*Anacardiaceae*), що зростає як дикорослий і культивований кущ у лісостепу та степу України, в горах Криму, а також у полезахисних лісонасадженнях [11].

Листя скумпії містить дубильні речовини, флавоноїди, фенолкарбонові кислоти та інші біологічно активні речовини [2, 8]. У медичній практиці лікарську рослину сировину (ЛРС) використовують як в'язучий, антисептичний, Р-вітамінний та жовчогінний засіб [5, 13]. У народній медицині використовують відвари та настої для промивання гнійних ран, при зубних болях і запаленні ясен, геморої, діареї, дизентерії та інших захворюваннях [6].

Метою роботи було дослідити протівірусні, антибактеріальні (протихламідійні і протирикетсійні) та імуностимулюючі властивості ліофілізованої фітосубстанції, отриманої з листків скумпії звичайної.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження був ліофілізований екстракт листків скумпії звичайної, отриманий згідно з розробленими оптимальними умовами, що володіє вираженою інтерферон-індукуючою

активністю. Для цього повітряно-суху сировину, подрібнену до розміру частинок 2-5 мм, обробляли хлороформом в апараті Соксклета при температурі кипіння розчинника протягом 15-18 год. до обезбарвлення зливів хлороформу. Висушену лікарську рослинну сировину екстрагували діетиловим ефіром у співвідношенні 1:15 при кімнатній температурі протягом 40 хв. при періодичному перемішуванні. Екстракцію діетиловим ефіром проводили 4 рази. Очищену таким чином від супутніх речовин (ліпофільні речовини та фенолокислоти) рослинну сировину висушували й екстрагували поліфенольні сполуки 50% етиловим спиртом. Поліфенольний комплекс виділяли вказаним розчинником впродовж 60 хв. 4 рази у співвідношенні 1:20. Об'єднані екстракти фільтрували і відганяли етанол за допомогою вакууму. Потім з екстракту осаджували потрійним об'ємом ацетону білковополісахаридний комплекс і фільтрували. Із фільтрату відганяли ацетон за допомогою роторного випарювача та водний залишок ліофільно висушували. Висушений екстракт представляє собою суму біологічно активних речовин поліфенольного характеру у вигляді гігроскопічного аморфного порошку світло-жовтого кольору, без запаху і терпкого смаку. Вихід кінцевого продукту становить 26,3%. У ліофілізаті виявлені дубильні речовини і флавоноїди [1, 7].

Вивчення протівірусної активності екстракту проводили в дослідях на мишах лінії СВА згідно з вимогами і методами, рекомендованими для оцінки протівірусних препаратів [15]. Дослідження проводили на моделі експериментального кліщового енцефаліту, викликаного внутрішньоочеревинним введенням мишам штаму Абсеттаров у дозі 35 ЛД 50/0,2 мл. Фітозасіб застосовували за різними лікувально-профілактичними схемами, враховуючи його інтерферон-індукуючі властивості. На кожну експериментальну умову використовували по 25-27 мишей, за якими спостерігали впродовж 21 дня. Ефективність препаратів оцінювали за ступенем захисту (%), що визначали як різницю у виживанні між дослідною і контрольною групами, а також за показниками середньої тривалості життя піддослідних тварин у порівнянні з контрольними. Статистичну обробку отриманих результатів проводили за методом Фішера-Стьюдента.

Дослідження протихламідійної активності проводили на моделі нелетальної генералізованої інфекції мишей лінії СВА (масою 10-12 г), яким внутрішньоочеревинно вводили по 0,1 мл 10% суспензії жовткових мішків курячих ем-

бріонів, що містили *Chlamidia trachomatis* (серовар L2, венерична лимфогранульома) [10]. Фітосубстанцію застосовували внутрішньоочеревинно за лікувально-профілактичними схемами в різні строки до і після інфікування, вказаними в табл. 2, після чого у 4-5 тварин кожної експериментальної групи на 4 і 9 добу перебування інфекції забирали проби легень. Ефективність екстракту оцінювали при титруванні інфекційності суспензії пулу взятих органів мишей у курячих зародках шляхом інфікування їх у жовтковий мішок, розраховуючи індекс ефективності, який визначали як різницю середнього строку загибелі ембріонів у досліді і контролі. Накопичення збудника в легенях також контролювали цитоскопічно фарбуванням мазків-відбитків методом імунофлуоресценції з хламідійною родоспецифічною антисироваткою і за Маккіавелло.

Протирикетсійну активність вивчали на моделі експериментальної інфекції Ку гарячки. Досліди здійснювали на білих нелінійних мишах масою 15-20 г при внутрішньоочеревинному введенні їм 35000 ІД 50 жовткової культури коксіел Бернета, штаму Гріта (перехідна 1-2 фаза) [14]. Ліофілізований екстракт застосовували внутрішньоочеревинно за різними лікувально-профілактичними схемами, враховуючи його інтерферон-індукуючі властивості. Критеріями ефективності служили середні показники маси селезінок, обсіменіння їх збудником, а також середні титри антитіл (у реакції непрямой флуоресценції) до 2 фази коксіел Бернета, які визначали на двох етапах інфекційного процесу, відповідно через 10 і 20 днів після інфікування. На кожну експериментальну умову використовували по 7-10 мишей.

Імуностимулюючі властивості екстракту скумпії звичайної оцінювали за здатністю впливати на продукцію у мишей лінії СВА (масою 18-20 г) сироваткових антитіл до Т-залежного антигену еритроцитів барана, що визначали загальноприйнятим мікрометодом постановки реакції геммаглютинації [3]. Імунізацію тварин проводили внутрішньоочеревинно 15% суспензією еритроцитів барана. Фітосубстанцію вводили внутрішньоочеревинно в різних дозах одноразово за 2 дні до імунізації, у цей же день та через 2 і 5 днів після неї. Забір сироваток крові для дослідження здійснювали на 7 і 14 добу після імунізації.

Для порівняльної характеристики й оцінки ефективності досліджуваного екстракту в якості прототипу за характером дії використовували відомий комерційний препарат аналогічного призначення ридостин за оптимальними схемами введення [4, 9].

ТАБЛИЦЯ 1

Противірусна активність екстракту скумпії звичайної

Препарати	Доза, мг/кг	Схеми введення в годинах до (-) і після (+) інфікування	% виживання	% захисту	P	Середня тривалість життя, днів
Ліофілізований екстракт скумпії звичайної	50	-24	42,9	16,0	>0,05	15,9
	20	-24	42,3	15,4	>0,05	13,9
	50	-24, +48, +120	52,2	25,3	>0,05	14,2
	20	-24, +48, +120	54,2	27,3	<0,05	15,1
	0,1	-4	38,5	11,6	>0,05	13,5
	5,0	+48				
	50	-24				
	0,1	-4	66,7	39,8	<0,01	16,5
	5,0	+48				
Ридостин	10	-24, +48	61,5	34,6	<0,01	16,9
Контроль вірусу (35 ЛД50)			26,9	-	-	13,1

Дослідження проводили при дотриманні принципів біоетики у відповідності до положень Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України №3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених I Національним конгресом України з біоетики (2001).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження противірусної активності, наведені в табл. 1, свідчать, що за всіма схемами введення фітоекстракт листків скумпії звичайної проявляє виражену протективну дію у відношенні до вірусу кліщового енцефаліту. При 3-разовому застосуванні високих і низьких доз даний екстракт викликав

значну противірусну резистентність, що досягла 39,8% захисту. В інших випадках фітосубстанція захищала від летальної інфекції 11,6-27,3% мишей. Аналогічний ефект ридостину в описаних умовах становив 34,6% захисту і був дещо нижчим від максимальної активності рослинного препарату. Про достовірну ефективність екстракту свідчать і показники середньої тривалості життя тварин, які на 0,8-3,4 дня були вищими від контрольних.

Таким чином, проведені дослідження свідчать, що отриманий ліофілізований екстракт скумпії звичайної володіє високою противірусною активністю, яка перевищувала при застосуванні за оптимальною схемою аналогічну дію відомого лікарського засобу ридостину, що дозволяє пропонувати його в якості потенційного противірусного препарату для профілактики та лікування кліщового енцефаліту.

Дані про протихламідійну активність екстракту наведені в табл. 2. Із них видно, що отримана фітосубстанція при всіх способах застосу-

ТАБЛИЦЯ 2

Протихламідійна дія екстракту скумпії звичайної

Препарати	Доза, мг/кг	Схеми введення (NN) в годинах до (-) і після (+) інфікування	Індекс ефективності	
			4 доба	9 доба
Ліофілізований екстракт скумпії звичайної	25	1-а -24, +48	1,2	1,0
	25	-24		
	0,1	2-а -4	2,0	3,0
	5	+48		
	25	-24		
	0,5	3-я -4	4,0	2,6
	0,05	+48		
	25	4-а -24	3,8	1,0
	5	-4, +24, +48		
Ридостин	10	-24, +48	2,4	2,1

ТАБЛИЦЯ 3

Протирикетсїйна активнїсть екстракту скумпїї звичайної

Групи спостереження, схеми введення в години до (-) і після (+) інфікування (мг/кг)	Середня маса селезїнок, мг	P**	Обсїменїння селезїнок, %	Титр антитїл у РНІФ, log2	P**
Лїофілізований екстракт скумпїї звичайної					
1. -24(25)	261±19	<0,05	25-75	3,5±0,5	>0,05
2. -24, +48, +120 (25)	225±15	<0,01	12,5	3,8±0,3	>0,05
3. -4 (0,1), +48 (5)	310±42	>0,05	50-75	4,1±0,5	>0,05
4. -24,+120(25),-4(0,1),+48 (5)	227±27	<0,01	12-25	3,9±0,5	>0,05
Ридостин					
5. -24, +48 (10)	340±17		50-100	3,7±0,2	>0,05
6. Контроль інфікованих мишей	371±41	-	50-100	4,1±0,3	-
7. Контроль інтактних мишей	105±3	-	-	-	-

Примїтки: у таблицї наведенї данї інфекційного процесу на 20 добу спостереження; ** – достовїрнїсть мїж дослідними групами та контролем <0,01.

вання володїє протихламїдїйним ефектом, який у деяких випадках значно перевищував аналогїчну дїю прототипного препарату ридостину.

Найбїльше пригнїчення розмноження хламїдїй виявлено на раннїх етапах розвитку інфекції (4 доба), коли при застосуваннї екстракту за 3 і 4 схемами индекс ефективностї відповідно становив 4,0 і 3,8, у той час як для ридостину вїн досягав лише 2,4. На пїзнїшїй стадїї інфекційного процесу (9 доба) рослинний лїофілізат, застосований за 2 і 3 схемами,

викликав при титруваннї проб легень інфікованих мишей збїльшення середнього строку загибелї ембріонів порівняно з контролем на 3,0 і 2,6 дня, що також вигїдно відрїзняло його від ридостину, для якого відповідний показник становив 2,1 дня. Середнї строки загибелї контрольних ембріонів, інфікованих пробами мишей, взятих на 4 і 9 добу, відповідно становили 13,4 і 11,4 дня.

Отже, за допомогою проведених досліджень було встановлено, що отриманий лїофілізова-

ТАБЛИЦЯ 4

Вплив екстракту скумпїї звичайної на продукцію сироваткових антитїл до еритроцитів барана у мишей

Схема введення	Доза в мг/кг		Титри антитїл в обернених величинах			
	екстракту скумпїї звичайної	ридостину	при введеннї екстракту скумпїї звичайної		при введеннї ридостину	
			7 доба	14 доба	7 доба	14 доба
За 2 днї до імунїзації	50	10	160	н.д.	320	640
	5	1	160-320*	320-640	320	640-1280
	1	-	160	320-640	н.д.	н.д.
	0,1	-	160	320-640	н.д.	н.д.
У день імунїзації	50	10	80	н.д.	320-640	1280
	5	1	160	640	640*	640-1280
	1	0,1	320**	640-1280	320	640
	0,1	0,01	160	128**0	640*	640
Через 2 днї після імунїзації	50	10	320**	н.д.	160-320	1280
	5	1	160	1280**	160	640
	1	0,1	160-320	320-640	160	640
	0,1	0,01	320**	320	320	640-1280
Через 5 днів після імунїзації	50	10	320**	н.д.	320	320-640
	5	1	320**	640	320-640	640-1280
	1	0,1	160	320-640	320	320-640
	0,1	0,01	320**	640	320	640
Контроль еритроцитів барана			80	320	160-320	640

Примїтки: * – зростання титрів антитїл у 3 рази; ** – зростання титрів антитїл у 4 рази; н.д. – не досліджували.

ний екстракт скумпії звичайної володіє вираженою протихламідійною активністю, яка перевищувала аналогічну дію відомого лікарського засобу ридостину.

У табл. 3 показані результати дослідження протирикетсійної активності ліофілізованої фітосубстанції. Отримані дані 1 етапу спостереження не виявили значного впливу обох препаратів на розвиток лихоманки Ку, однак результати на 20 добу свідчать про виражену протирикетсійну активність. Доказом цього є достовірне зниження в порівнянні з контролем маси селезінок мишей у 1, 2 і 4 групах, у той час як ридостин (5 група) не проявив чіткого захисного ефекту. Про гальмування досліджуваним фітозасобом розвитку інфекції вказує і ступінь обмінення збудником селезінок тварин, оброблених екстрактом за 3-4 разовими схемами введення (2, 4 групи). Ридостин же в описаних умовах експерименту на кількість коксіел у селезінках інфікованих мишей майже не впливав.

Аналізуючи дані гуморального імунітету при лихоманці Ку, слід відзначити, що рівні антитіл в 1, 2, 4 і 5 групах дещо нижчі від контрольних показників, що можна вважати наслідком певної здатності препаратів інгібувати розмноження рикетсій і, як результат, меншого порівняно з контролем антигенного подразнення імунітетів.

Таким чином, проведені дослідження свідчать, що отримана фітосубстанція з листків скумпії володіє вираженою протирикетсійною активністю, яка перевищувала аналогічну дію ридостину.

Отримані результати досліджень стимуляції антитілогенезу ліофілізованим екстрактом скумпії наведені в табл. 4. Із даних останньої видно, що отримана фітосубстанція володіє вираженим впливом на гуморальний імунітет мишей, посилюючи рівень антитілоутворення в порівнянні з контролем у 2-4 рази. Характерно, що цей стимулюючий ефект виявлений і на 7, і на 14 день імунної відповіді, причому при введенні екстракту за 3 схемами — у день імунізації, через 2 і 5 днів після неї, що свідчить про достовірність отриманих результатів. В описаних умовах дослідження стимулюючий вплив ридостину на антитілогенез був слабшим і не перевищував 3-разового зростання титрів антитіл порівняно з контролем. Максимальне посилення імунної відповіді реєстрували тільки на 7 добу і при введенні прототипу лише в день імунізації.

Наведені результати досліджень свідчать, що ліофілізований фітоекстракт скумпії звичайної має виражену здатність стимулювати

антитілоутворення, яка за інтенсивністю переважає аналогічний ефект прототипу.

Окрім цього варто відзначити невисоку токсичність досліджуваного екстракту, що в 1,6 разу нижча, ніж у ридостину, та його виражені інтерферон-індукуючі властивості [1].

Підсумовуючи все вищесказане, можна зробити висновок про перспективність використання ліофілізованого екстракту листків скумпії звичайної для розробки та створення нових лікарських засобів для профілактики та лікування численних інфекційних захворювань.

ВИСНОВКИ

1. Ліофілізований екстракт скумпії звичайної володіє вираженою противірусною дією в досліді на моделі кліщового енцефаліту, що в окремих випадках перевищувала дію препарату порівняння ридостину.

2. Встановлена антибактеріальна дія фітосубстанції з листків скумпії при експериментальних інфекціях, викликаних хламідіями та рикетсіями.

3. Виявлена та досліджена здатність екстракту листків скумпії звичайної стимулювати антитілогенез, що за інтенсивністю дії переважає аналогічний ефект прототипу ридостину.

4. Досліджені противірусні, антимікробні та імуностимулюючі властивості скумпії звичайної свідчать про перспективність її використання для створення нових противірусних та антибактеріальних препаратів широкого спектра дії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дослідження інтерфероніндукуючих властивостей біологічно активних речовин, отриманих із *Cotinus coggygia* Scop. / І.Л.Бензель, М.М.Козловський, Г.В.Крамаренко, Л.В.Бензель // Фармацевтичний часопис. — 2008. — №3 (7). — С. 62-68.
2. Бузашвили І.Ш. Содержание полифенольных соединений в листьях *Rhus coriaria* L. и *Cotinus coggygia* Scop. / И.Ш.Бузашвили, Н.Ф.Комиссаренко, Д.Г.Колесников // Растительные ресурсы. — 1972. — Т.8, Вып.2. — С. 237-240.
3. Иммунологические методы / Под. ред. Г.Фримеля. — М.: Медицина, 1987. — С. 211-219.
4. Использование иммуностимуляторов для повышения иммуногенности герпетической вакцины / И.Ф.Баринский, Т.Ф.Семенова, Т.А.Посева [и др.] // Вопросы вирусологии. — 1993. — №6. — С. 274-276.
5. Лавренов В.К. Полная энциклопедия лекарственных растений. Т.ІІ. / В.К.Лавренов, Г.В.Лавренова. — СПб.: Нева, 1999. — С. 393.
6. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А.М.Гродзінський. — К.: Голов. ред. УРЕ, 1989. — С. 400-401.

7. Патент 79377 Україна, МПК А61К 36/22; А61Р 37/04. Спосіб одержання інтерфероніндукуючого засобу зі скумпії звичайної (*Cotinus coggygria*) / М.М.Козловський, Л.В.Бензель, І.М.Лозинський [та ін.]; заявник і патентовласник Львівський НДІ епідеміології та гігієни. — №а200510597; Заявл. 09.11.2005; Опубл. 11.06.2007; Бюл. №8.
8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. — Л.: Наука, 1988. — С. 20-21.
9. Ридостин — новый перспективный препарат неспецифической защиты организма от вирусной инфекции / И.В.Тимофеев, Т.Ф.Палецкая, Н.Г.Казанков [и др.] / Интерферон-92. — М., 1992. — С. 143-149.
10. Сайиткулов А.М. Антихламидийная активность растительных индукторов интерферона / А.М.Сайиткулов, Н.А.Виноград, Э.Б.Тазулахова // Интерферон-92. — М., 1992. — С. 171-177.
11. Справочник по заготовкам лекарственных растений / Д.С.Ивашин, З.Ф.Катина, И.З.Рыбачук [и др.] — К.: Урожай, 1986. — С. 208-209.
12. Сур С.В. Проблемы и перспективы разработки и внедрения современных лекарственных средств растительного происхождения / С.В.Сур, Е.Н.Гриценко // Фарматека. — 2001. — №9-10. — С. 10-14.
13. Чекман І.С. Клінічна фітотерапія / І.С.Чекман. — К.: Рада, 2006. — 656 с.
14. Химиотерапевтическая эффективность доксицилина при экспериментальной Ку-рикетсиозной инфекции / А.В.Никитин, Н.Д.Климчук, И.П.Фомина, В.Н.Роздобутько // Антибиотики и химиотерапия. — 1991. — №1. — С. 22-26.
15. Чижов Н.П. Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций / Н.П.Чижов, Ф.И.Ершов, М.К.Индулен. — Рига: Зинатне, 1988. — 171 с.

И.Л.Бензель, М.М.Козловский, Н.А.Виноград, О.Л.Бензель. Получение и изучение фармакологической активности полифенольного комплекса листьев скумпии обыкновенной. Львов, Украина.

Ключевые слова: фитосубстанция, скумпия обыкновенная, полифенольные соединения, противовирусное действие, противомикробное действие, антителогенез.

Используя оптимальные условия экстракции из листьев скумпии обыкновенной, был получен лиофилизированный фитоконкомплекс биологически активных веществ полифенольной природы. Исследованы его противовирусные, противохламидийные, противорикетсионные и иммуностимулирующие свойства.

I.L.Benzel, M.M.Kozlovsky, N.O.Vynograd, O.L.Benzel. Obtaining of polyphenolic complex from *Cotinus coggygria* Scop. leaves and study of its pharmacological activity. Lviv, Ukraine.

Key words: phytosubstance, *Cotinus coggygria* Scop., polyphenolic substances, antiviral effect, antimicrobial effect, antibody response.

We obtained lyophilized phytocomplex of biologically active substances of polyphenolic nature using the optimal conditions of extraction from *Cotinus coggygria* Scop. leaves. Its antiviral, anticlamydial, antirickettsial and immunostimulating effects have been studied.

Надійшла до редакції 17.06.2010 р.