

© Коллектив авторов, 2006

С. М. Николаев, В. Б. Хобракова, Т. А. Ажунова, П. Б. Лубсандоржиева,  
Л. Х. Муханова, А. А. Унагаева

## ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПРОТИВОЯЗВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА “ВЕНТРОФИТ”

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ

Разработан комплексный противоязвенный растительный экстракт “Вентрофит”. Установлено количественное содержание основных групп биологически активных веществ: водорастворимых (флавоноиды, полисахариды, аскорбиновая кислота, антоцианы, дубильные вещества) и липофильных (тритерпеновые сапонины, кумарины, каротиноиды). В опытах на мышах линий СВА и F1 (СВА × С57В1/6) установлена иммуномодулирующая активность исследуемого средства в условиях азатиоприновой иммунодепрессии, которая выражалась в повышении показателей клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа.

Инфекция, вызванная *Helicobacter pylori* (НР), является одной из распространенных инфекций в мире [1].

При НР-ассоциированной язвенной болезни желудка повышается продукция интерферона- $\gamma$  [2], длительная и чрезмерная продукция которого нарушает метаболизм и секрецию слизи и соляной кислоты, а также обуславливает повреждение эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта [3]. Наряду с этим, патогенез хеликобактериоза связан с интенсивным взаимодействием НР с клетками покровного эпителия желудка с последующей продукцией хемокинов и цитокинов, способствующей повышению миграции и активации нейтрофилов в зоне поражения. Непосредственное выделение фагоцитами активных кислородных радикалов (КР) и ферментов в слизистую вызывает воспалительный процесс, приводящий к повреждению клеток и тканей желудка. Фагоцитоз НР нейтрофилами цельной крови сопровождается усиленной внутриклеточной продукцией активных КР.

Можно предположить, что одной из основных причин недостаточной эффективности антихеликобактерной терапии является растущая резистентность НР к антибиотикам, связанная с общим ослаблением иммунного ответа организма. В то же время, не исключено угнетающее влияние на иммунитет самого микроорганизма, в частности, вызываемое им нарушение фагоцитарных функций хозяина [4]. Повысить результативность лечения НР-инфекции можно двумя путями: либо проводить поиск новых эффективных антибиотиков, либо воздействовать на иммунный ответ пациента. Первый путь чреват неуклонным ростом антибиотикорезистентности, в то время как второй представляется наиболее логичным и перспективным [5].

В этой связи целью настоящей работы явилось определение иммуномодулирующих свойств нового комплексного противоязвенного растительного средства “Вентрофит”.

### Экспериментальная химическая часть

В состав вентрофита (условное название) входят: сухие экстракты из соцветий календулы лекарственной *Calendula officinalis* L., листьев подорожника большого *Plantago major* L., травы сушеницы топяной *Gnaphalium uliginosum* L., корней солодки уральской *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., корней девясила высокого *Inula helenium* L., плодов боярышника кроваво-красного *Crataegus sanguinea* Pall., плодов шиповника *Rosa* L., плодов облепихи крушиновидной *Hippophae rhamnoides* L., и плодов кориандра посевного *Coriandrum sativum* L.

Для изучения качественного состава экстрактов хроматографическими методами получены гексановая (каротиноиды), хлороформная (тритерпеновые кислоты, агликоны флавоноидов), этилацетатная (гликозиды флавоноидов, фенолокислоты) фракции. Использованы системы растворителей: для тонкослойной хроматографии на силикагеле (ТСХ) – бензол – этилацетат – метанол (50:1:1) – I; бензол – ацетон (8:2) – II; бензол-метанол (9:1) – III; бензол – эфир (1:1) – IV; гексан-этилацетат (7:3) – V; гексан – этилацетат – муравьиная кислота (15:9:2) – VI; этилацетат – муравьиная кислота – уксусная кислота – вода (100:11:11:26) – VII; бензол – этилацетат (2:1) – VIII; толуол – этилацетат (93:7) – IX; для бумажной двухмерной хроматографии (БХ) – 15 % уксусная кислота – X; бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2) – XI. Для обнаружения сесквитерпеновых лактонов использованы 20 % раствор фосфорно-молибденовой кислоты, 1 % раствор ванилина в концентрированной серной кислоте, тритерпеновых соединений — 20 % раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК), фенолокислот — пары аммиака.

В препарате вентрофит идентифицированы: рутин,  $R_f$  — 0,35 (ТСХ, VII); 0,48 (БХ, X); 0,18 (БХ, XI); гиперозид,  $R_f$  — 0,60 (ТСХ, VII); 0,30 (БХ, X); 0,41 (БХ,

Таблица 1  
Содержание флавоноидов и каротиноидов в суммарном экстракте препарата вентрофит

№	Серия	Влажность, %	Содержание флавоноидов, %	Содержание каротиноидов, мг. %
1	7.06.04.	3,92	2,26	6,18
2	10.05.04.	3,45	2,98	6,57
3	14.06.04.	3,87	2,09	5,98
4	02.07.04.	3,55	2,23	6,50
5	13.09.04.	3,82	2,42	6,36

XI); олеаноловая кислота,  $R_f$  — 0,40 (ТСХ, II); 0,65 (ТСХ, VIII); урсоловая кислота,  $R_f$  — 0,55 (ТСХ, VIII); кофейная кислота,  $R_f$  — 0,46 (ТСХ, VI); 0,48 (БХ, X); 0,70 (XI); феруловая кислота,  $R_f$  — 0,28 (ТСХ, VI), 0,23 (БХ, X); 0,78 (БХ, XI); глицирризиновая кислота,  $R_f$  — 0,36 (ТСХ, XIII);  $\beta$ -каротин,  $R_f$  — 0,9 (ТСХ, II, IV, V).

Количественное определение биологически активных веществ проведено по описанным в литературе методам: флавоноидов, дубильных веществ, антоцианов, водорастворимых полисахаридов по методикам Государственной Фармакопеи СССР XI изд.; аскорбиновой кислоты — фотоколориметрическим методом [6]; каротиноидов [7], тритерпеновых сапонинов [8], кумаринов [9] — спектрофотометрическим методом; глицирризиновой кислоты [10], рутина, гиперозида [11; 12], — хроматоспектрофотометрическим методом.

Содержание биологически активных веществ в вентрофите составляет: флавоноидов в пересчете на рутин-стандарт —  $2,26 \pm 0,01$  %; гиперозида —  $0,18 \pm 0,01$  %; рутина —  $0,39 \pm 0,01$  %; антоцианов в пересчете на цианидин-3,5-диглюкозид —  $0,18 \pm 0,01$  %; аскорбиновой кислоты —  $0,41 \pm 0,01$  %; дубильных веществ в пересчете на танин —  $1,30 \pm 0,06$  %, водорастворимых полисахаридов —  $15,0 \pm 0,4$  %; тритерпеновых сапонинов в пересчете на урсоловую кислоту —  $0,070 \pm 0,001$  %; глицирризиновой кислоты —  $2,12 \pm 0,02$  %; каротиноидов в пересчете на  $\beta$ -каротин —  $6,16 \pm 0,11$  мг%; кумаринов в пересчете на скополетин —  $0,080 \pm 0,001$  %. Для стандартизации суммарного экстракта выбрана спектрофотометрическая методика определения каротиноидов в пересчете на  $\beta$ -каротин [7] и спектрофотометрическая методика определения флавоноидов.

Таблица 2  
Влияние вентрофита на выраженность реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

Группа животных	ИР ГЗТ, %
Интактная	$22,10 \pm 1,80$
Контрольная (азатиоприн)	$14,22 \pm 1,27$
Опытная (азатиоприн + вентрофит)	$24,75 \pm 2,35^*$

Примечание: здесь и далее \* означает, что разница существенна ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с контролем.

Таблица 3  
Влияние вентрофита на процессы антителообразования

Группа животных	Количество АОК	
	на селезенку	на $10^6$ спленоцитов
Интактная	$70773 \pm 3061$	$440 \pm 33$
Контрольная (азатиоприн)	$33075 \pm 2831$	$271 \pm 18$
Опытная (азатиоприн + вентрофит)	$79136 \pm 6797^*$	$492 \pm 48^*$

Установлено, что для максимального извлечения каротиноидов достаточно 2-кратной экстракции *n*-гексаном при комнатной температуре и при соотношении сырья — экстрагент 1:20, первая экстракция проводится в течение 2 ч, вторая — 0,5 ч. Определение флавоноидов проводят при следующих параметрах экстракции: экстрагент — 70 % этиловый спирт, соотношение экстракт — экстрагент — 1:50, кратность экстракции — 2, I экстракция — 45 мин, II — 30 мин, температура экстракции — 80 – 90 °С.

В табл. 1 приведены данные о содержании флавоноидов и каротиноидов в суммарном экстракте.

Содержание флавоноидов в суммарном экстракте можно нормировать — не менее 2 %, каротиноидов — не менее 5 мг %.

#### Экспериментальная биологическая часть

Эксперименты проведены на 45 мышах обоего пола линий СВА и F<sub>1</sub> (СВА × С57В1/6) массой 18 – 20 г. Контролем служила группа мышей с иммунодефицитом, вызванным введением азатиоприна в дозе 50 мг/кг перорально 1 раз в сутки в течение 5 дней. Водный раствор вентрофита вводили опытной группе мышей (на фоне азатиоприна) в дозе 50 мг/кг перорально ежедневно в течение 14 дней. Действие испытуемого средства на состояние клеточного звена иммунного ответа оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [13], гуморального звена — по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза [14], макрофагального звена — по фагоцитозу перитонеальных макрофагов мышей в отношении *Staphylococcus aureus in vitro*, при этом оценивали следующие показатели фагоцитоза: активность (процент фагоцитирующих клеток из общего числа подсчитанных клеток) и ин-

Таблица 4  
Влияние вентрофита на функциональную активность перитонеальных макрофагов

Группа животных	Показатели фагоцитоза	
	активность	интенсивность
Интактная	$80,33 \pm 3,08$	$7,90 \pm 0,43$
Контрольная (азатиоприн)	$48,75 \pm 4,39$	$4,10 \pm 0,17$
Опытная (азатиоприн + вентрофит)	$75,20 \pm 1,92^*$	$6,60 \pm 0,22^*$

тенсивность (среднее число *St. aureus*, поглощенное одной клеткой) [15]. Полученные результаты обработаны статистическим методом с помощью критерия Манна – Уитни [16].

Животных содержали в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

В результате проведенных исследований выявлена иммуномодулирующая активность вентрофита: его курсовое введение на фоне азатиоприновой иммуносупрессии стимулирует клеточное, гуморальное и макрофагальное звенья иммунного ответа организма.

Установлено, что под влиянием вентрофита отмечается восстановление индекса реакции ГЗТ (ИР ГЗТ) в условиях азатиоприновой иммуносупрессии (азатиоприн снижает ИР ГЗТ на 36 %) (табл. 2).

При оценке влияния вентрофита на состояние гуморального звена иммунного ответа установлено, что он вызывает увеличение абсолютного и относительного количества АОК (табл. 3).

Как следует из данных табл. 4, введение вентрофита на фоне азатиоприна стимулирует функциональную активность макрофагов, что выразилось в повышении активности и интенсивности фагоцитоза.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают наличие у вентрофита иммуномодулирующего действия, которое заключалось в усилении фагоцитарной активности, увеличении числа АОК и стимуляции клеточно-опосредованной реакции ГЗТ на фоне азатиоприновой иммуносупрессии. Можно предположить, что испытуемое растительное средство способно коррегировать иммунный статус организма даже у боль-

ных с заведомо дефектным иммунологическим фоном — в частности, при нодулярных гастритах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. К. Г. Гуревич, И. В. Маев, *Качественная клиническая практика*, 1, 175 – 178 (2001).
2. J. Bauditz, M. Ortner, M. Bierbaum, et al., *Clin. Experimental Immunol.*, **117**, 316 – 323 (1999).
3. S. Takahashi, E. Nakamura, and S. Okabe, *Dig. Dis. Sci.*, **43**, 2301 – 2308 (1998).
4. А. А. Барсуков, В. Г. Жуховицкий, Э. Г. Щербакова и др., *Бюл. экспер. биол. мед.*, **1**, 79 – 82 (2005).
5. Е. А. Корниенко, С. Н. Дроздова, Н. Б. Серебряная, *Фарматека*, **7**, 68 – 69 (2005).
6. Е. А. Приступа, Д. М. Попов, *Актуальные проблемы фармацевтической технологии*, Науч. Тр. ВНИИФ, **32**, 151 – 159 (1997).
7. О. В. Евдокимова, И. А. Самылина, О. В. Нестерова, *Фармация*, **6**, 70 – 72 (1992).
8. И. А. Муравьев, В. В. Шатило, В. Ф. Семенченко, *Химия природных соединений*, **6**, 738 – 740 (1972).
9. И. И. Чемесова, С. Л. Чубарова, Е. И. Саканян и др., *Растит. ресурсы*, **1**, 86 – 91 (2000).
10. М. Р. Якубова, Г. Л. Генкина, Т. Т. Шакиров, *Химия природных соединений*, **6**, 802 – 806 (1977).
11. И. Г. Левашова, Н. Ф. Комисаренко, В. П. Жданова, Л. В. Шатунов, *Проблемы стандартизации и контроля качества лекарственных средств*, Москва (1991).
12. М. С. Лукьянчиков, *Химия природных соединений*, **1**, 43 – 45 (1984).
13. Р. В. Петров, Р. М. Хаитов, Л. Н. Череев и др., *Иммуномодуляторы*, Москва (1987).
14. A. J. Cunningham, *Nature*, **207** (5001), 1106 – 1107 (1965).
15. И. С. Фрейдлин, *Методические рекомендации*, Ленинград (1976).
16. В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева, *Математическая статистика в клинических исследованиях*, Медицина, Москва (2001).

Поступила 27.07.05

## IMMUNOMODULATING EFFECT OF THE ANTIULCEROUS DRUG VENTROPHIT

S. M. Nikolaev, V. B. Khobrakova, T. A. Azhunova, P. B. Lubsandorzhieva, L. Kh. Mukhanova, and A. A. Unagaeva

Institute of General and Experimental Biology, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Buryatia, Russia

A new complex antiulcerogenic plant extract Ventrophit has been created. The quantitative content of basic groups of water-soluble (flavonoids, polysaccharides, vitamin C, antocyanins, tannins) and lipophilic (triterpene saponins, coumarins, carotenoids) biologically active substances has been determined. The immunomodulating activity of Ventrophit with respect to immunodepression induced by azathioprine has been established in experiments on CBA and F1 (CBA r C57Bl/6) mice. The extract increased the characteristics of cellular, humoral and macrophage chains of the immune response.