

И. Г. Николаева, В. Б. Хобракова, С. М. Баторова, Г. Г. Николаева,
С. М. Николаев, А. Г. Горшков, А. Л. Верещагин, К. В. Парьева, Х. П. Монголов

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ НОВОГО СРЕДСТВА “ИММУНОФИТ”, СОЗДАННОГО НА ОСНОВЕ ПРОПИСЕЙ ТИБЕТСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ;
Лимнологический институт СО РАН, Иркутск.

Разработано средство “Иммунофит” на основе прописей тибетской медицины. Изучен состав эфирного масла из него. Установлен микроэлементный состав исходного сбора и водно-спиртового экстракта из него. В экспериментах на мышах линий СВА и F1 (СВА × С57В1/6) установлена выраженная иммуномодулирующая активность полученного средства при экспериментальной азатиоприновой иммуносупрессии.

Возросший в последние годы интерес к фитопрепаратам, применяющимся для лечения и профилактики многих острых и хронических форм заболеваний, обусловлен тем, что входящие в их состав природные биологически активные вещества (БАВ) эволюционно более близки организму человека, чем синтетические и легко включаются в процессы метаболизма. В связи с этим перспективным представляется разработка комплексных лекарственных средств, безопасных при длительном применении и доступных для широких слоев населения.

Известно, что одной из особенностей восточной медицины является использование для лечения многокомпонентных средств [1] и считается, что их высокая фармакотерапевтическая эффективность обусловлена гармоничным сочетанием содержащихся биологически активных веществ в исходных видах растительного сырья. В настоящее время существуют различные подходы к составлению сложных комплексных лекарственных препаратов. В тибетской и монгольской медицинских системах все лекарственные средства применяются в виде многокомпонентных смесей. В рецепты входят от трех до нескольких десятков ингредиентов. Такая сложность рецептуры находит свое обоснование в принципах лечения, принятых в традиционной медицине Тибета и Монголии. Согласно этим принципам лекарство должно одновременно действовать не только на разные симптомы болезни или на ее причину, но также регулировать обмен веществ и укреплять организм больного. Суть заключается в одновременном применении препаратов из трех основных групп: направленных на устранение (ослабление) причины заболевания, уменьшение патогенетических изменений, которые сопровождают болезнь, и усиление (мобилизацию) защитных, компенсаторно-приспособительных механизмов организма. Таким образом, многокомпонентные сборы — это своеобразные регулирующие системы, которые действуют на различных уровнях организации функциональных систем.

Арсенал современных иммуномодуляторов достаточно обширен, и в основном, это синтетические лекарственные средства. Значительное место среди них начали занимать средства природного происхождения,

однако, иммуноактивные продукты высших растений изучены в значительно меньшей степени.

Цель настоящей работы — разработка, фитохимическое изучение и определение иммуномодулирующих свойств нового средства “Иммунофит”, созданного на основе прописей тибетской медицины.

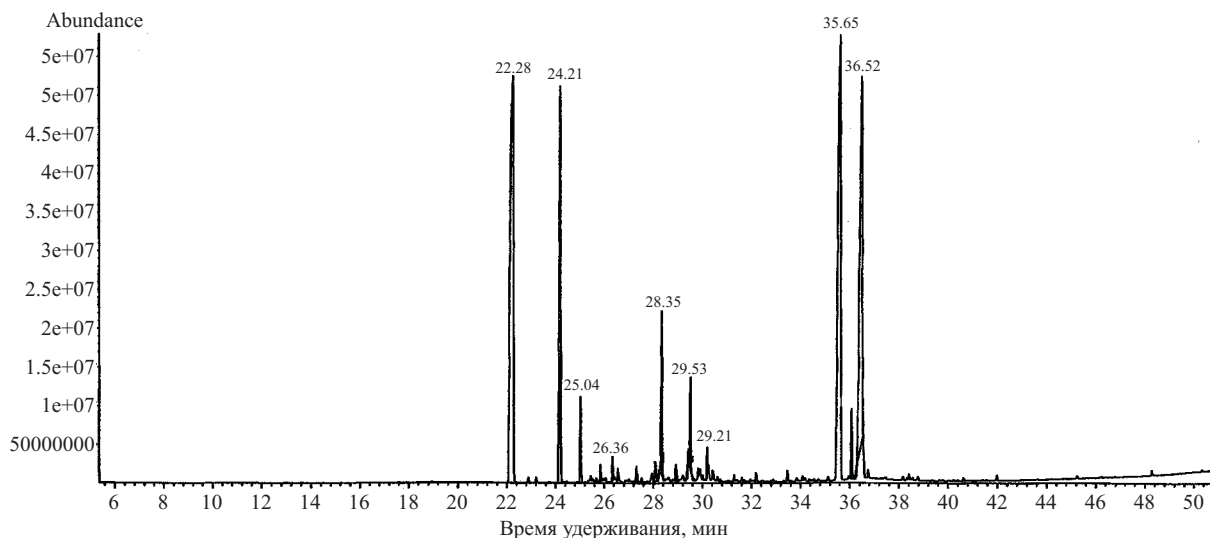
Прототипом модифицированного иммуномодулирующего средства послужила тибетская пропись “ли-ши сум-тханг”, что означает в переводе с тибетского “Гвоздика-3”. В практике традиционной медицины Тибета и Монголии отвар лекарственной смеси “Гвоздика-3” применяется при расстройстве системы мкхрис (пищеварения), а также заболеваниях селезенки [2, 3]. В состав прописи входят бутоны цветков гвоздики, плоды шиповника иглистого и боярышника кровавокрасного. Для усиления иммуномодулирующих свойств в состав сбора были включены четыре официальных растения, обладающих выраженными иммуномодулирующими свойствами [4, 5].

Компоненты сбора “Иммунофит” содержат комплекс биологически активных веществ: флавоноиды (кверцетин, кемпферол, байкалин, астрагалин, гиперозид и др.), дубильные вещества, полисахариды, три-терпеноиды, фенолкарбоновые и органические кислоты, витамин С и др., обеспечивающие достаточно широкий диапазон фармакологической активности.

Экспериментальная химическая часть

В состав композиции входят лекарственные растения — девясил высокий (*Inula helenium L.*, сем. *Asteraceae Dumort*) [6] и гвоздика (*Eugenia caryophyllata Thunb.*, сем. *Myrtaceae*), одним из основных действующих веществ которых является эфирное масло [7]. Методом перегонки с водяным паром выделено эфирное масло из композиции [8], выход составил 0,72 %. В последующем методом газовой хроматографии с масс-спектральной детекцией исследован компонентный состав масла.

Анализ. Эфирное масло отбирали микрошприцем, разбавляли хлороформом и автосамплером вводили в колонку. Испытания выполняли на газовом хроматографе Agilent 5973N + GC6890, колонка Ultra-2 (5 % фенилметилсилоксан) 50 м, внутренний диаметр



Хроматограмма эфирного масла иммуномодулирующего сбора

320 мкм, подвижная фаза — поток гелия 1 мл/мин, температура 70 °С — 2 мин, далее увеличение температуры до 310 °С со скоростью 5 °С/мин и еще 20 мин при этой же температуре. Температура инжектора 260 °С, температура ионного источника 230 °С, температура квадруполя 150 °С, сканирование в диапазоне масс — 42 – 500. Идентификация осуществлялась по базам данных PBM и NIST на 150 000 соединений.

Хроматограмма эфирного масла сбора представлена на рисунке. Идентифицировано более 20 соединений. Основные из них — оксид кариофилена, эвгенол, кариофилен, α-кариофилен, α-фарнезен и другие — представлены в табл. 1. Эвгенол является основным компонентом эфирного масла бутонов гвоздики, содержание его в эфирном масле бутонов гвоздики достигает 40 % [7].

Известно, что фармакологическую активность растительного комплекса, наряду с другими биологически активными веществами, обеспечивает и минеральный состав, в том числе и микроэлементы. Для многих из них установлена эффективность при лечении ряда заболеваний. Определение минерального состава, включая микроэлементы, проводили на спектрографе ДФС-8 с плоской дифракционной решеткой методом эмиссионного спектрального анализа. В качестве об-

разцов были взяты зола иммуномодулирующего сбора и озоленный жидкий водно-спиртовой экстракт из композиции. Результаты анализа минерального состава иммуномодулирующего сбора и полученного из него жидкого водно-спиртового экстракта представлены в табл. 2.

Как следует из представленных в табл. 2 данных, иммуномодулирующий сбор и жидкий водно-спиртовой экстракт богаты макро- и микроэлементами. Отмечается наибольшее содержание кальция, магния, натрия, кремния, фосфора, а также присутствие в значительных количествах марганца, железа, бария, меди. Натрий легко экстрагируется и переходит в жидкий экстракт почти полностью.

Одной из важных систем организма, определяющих гомеостатическую регуляцию организма, является иммунная система. Известно, что эфирные масла растений обладают стимулирующим влиянием на иммунную систему [9]. Кроме этого роль минерального состава, особенно микроэлементов, в регуляции основных звеньев этой системы очень важна. Показано, что малые, биотические дозы микроэлементов стимулируют многие функции организма, усиливают и иммунные механизмы защиты [10]. В этом плане использование растительного средства (в форме сбора или жидкой лекарственной формы), содержащего комплекс биологически активных веществ, макро- и микроэлементы, представляет несомненный клинический интерес.

Экспериментальная фармакологическая часть

Эксперименты проведены на мышах-самцах линии СВА и мышах-гибридах 1-го поколения F₁ (СВА × С57Bl/6) обоего пола массой 18 – 20 г.

Контролем служила группа мышей, которым вводили иммунодепрессант-цитостатик азатиоприн (имуран) перорально 1 раз в сутки в дозе 50 мг/кг в течение 5 дней. “Имунофит” (водно-спиртовой жидкий экстракт) из расчета 10 мл/кг деалкоголизировали и

Таблица 1

Основные компоненты эфирного масла иммуномодулирующего средства

Наименование вещества	Время удерживания, мин
Эвгенол	22,28
Кариофилен	24,21
α-Кариофилен	25,04
α-Фарнезен	25,86
Миртенил ацетат	27,33
Оксид кариофилена	28,35
Дибутилфталат	36,09
Производное нафтофурана	36,52

Минеральный состав золы иммуномодулирующего сбора и золы водно-спиртового жидкого экстракта из него

Название объекта	Содержание в %										
	Ca	Ba	Mg	Na	Si	Cu	P	Mn	Zn	Co	Fe
Сбор иммуномодулирующий (СИ)	10	0,10	10	5	8	0,03	10	0,30	0,100	0,0008	0,30
Водно-спиртовый экстракт СИ	3	0,02	6	4	1	0,01	3	0,08	0,008	0,0008	0,06

Таблица 3

Влияние “Имунофита” на выраженность гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

Группы животных	Доза	ИР ГЗТ, %
Интактная (n = 10)	—	21,49 ± 1,64
Контрольная (Аз) (n = 10)	50 мг/кг	14,21 ± 0,91
Аз + “Имунофит” (n = 10)	10 мл/кг	23,73 ± 2,06*

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

Таблица 4

Влияние “Имунофита” на антителообразование

Группы животных	Доза	Количество АОК	
		на селезенку	на 10 ⁶ спленоцитов
Интактная (n = 10)	—	97559 ± 7256	752 ± 56
Контрольная (Аз) (n = 10)	50 мг/кг	42948 ± 2853	323 ± 30
Аз + “Имунофит” (n = 10)	10 мл/кг	88737 ± 4676*	435 ± 25*

* — Разница существенна ($p \leq 0,05$) по сравнению с контролем.

вводили опытной группе животных на фоне азатиоприна (Аз) (на 6-й день после введения азатиоприна) перорально ежедневно в течение 14 дней. Интактная группа животных получала дистиллированную воду по аналогичной схеме.

Состояние клеточного иммунитета оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) согласно стандартной методике локальной ГЗТ [11]. Мышей сенсibilизировали внутрибрюшинным введением 1 мл/мышь 0,1 %-ой взвеси эритроцитов барана (ЭБ) в физиологическом растворе (на 15-й день с момента начала введения азатиоприна). На 4-е сутки под подошвенный апоневроз задней лапки вводили разрешающую дозу антигена — 50 мкл 50 %-ой взвеси ЭБ. В контрлатеральную лапку инъецировали физиологический раствор в том же объеме. Оценку реакции ГЗТ проводили спустя 24 ч по разнице массы опытной (P_о) и контрольной (P_к) лапок. Обе лапки отрезали сразу же после забоя животных по голеностопному суставу. Индекс реакции (ИР) вычисляли по формуле:

$$\text{ИР} = \frac{P_o - P_k}{P_k} \cdot 100\%.$$

Состояние гуморального иммунитета оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК), определяемых методом локального гемолиза согласно [12]. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе 2 · 10⁸ клеток/мышь (на 15 день с момента начала введения азатиоприна). Величину иммунного ответа оценивали по числу АОК на селезенку и на 10⁶ клеток с ядрами на 5-е сутки после иммунизации.

Достоверность экспериментальных данных определяли с помощью критерия Стьюдента [13].

Влияние “Имунофита” на состояние клеточного звена иммунного ответа определяли по реакции ГЗТ. Азатиоприновая иммунодепрессия проявилась в угнетении индекса реакции ГЗТ на 34 % по сравнению с таковым в интактной группе (табл. 3). После введения животным “Имунофита” на фоне азатиоприна отмечали увеличение индекса реакции ГЗТ на 40 % по отношению к контролю.

При исследовании влияния “Имунофита” на процессы антителообразования установлено, что испытываемое средство восстанавливает показатели гуморального иммунного ответа в условиях азатиоприновой иммуносупрессии. Введение азатиоприна приводило к снижению как абсолютного числа АОК, так и числа АОК на 10⁶ спленоцитов на 56 и 57 % соответственно, по сравнению с теми же показателями в интактной группе (табл. 4).

При введении исследуемого средства на фоне иммуносупрессии наблюдали достоверное увеличение количества АОК как в абсолютных значениях, так и при расчете на 10⁶ спленоцитов; при этом первый показатель превышал уровень азатиоприновой супрессии в 2,1 раза, а второй показатель — в 1,4 раза.

Таким образом, исследование иммуномодулирующих свойств “Имунофита” выявило его эффективность по отношению к реакциям клеточного и гуморального звеньев иммунного ответа при экспериментальной азатиоприновой иммуносупрессии. Исследуемое средство в объеме 10 мл/кг способно ослаблять супрессивное действие азатиоприна на клеточноопосредованную иммунную реакцию ГЗТ и антителогенез.

Установленное иммуномодулирующее действие комплексного растительного средства “Имунофит”

обусловлено наличием биологически активных веществ и микроэлементов. В частности, корневища девясила высокого содержат полисахариды, обладающие выраженными иммуномодулирующими свойствами [14]. Кроме того, в литературе отмечена иммуномодулирующая активность отвара данного растения по отношению к процессам антителообразования [15]. Также из литературных источников известно, что многие виды семейства розоцветных (боярышник кроваво-красный, шиповник) являются перспективными иммуномодуляторами [16]. В целом, очевидно, что иммуномодулирующая активность исследуемого средства обусловлена совокупным действием комплекса БАВ растений.

Таким образом, учитывая принципы тибетской медицины, нами обоснован оптимальный компонентный состав средства "Имунофит". Установлен качественный состав эфирного масла сбора "Имунофит". Установлен микроэлементный состав сбора и жидкого экстракта из него. Экспериментально обоснована выраженная иммуномодулирующая активность полученного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. А. Гриневич, *Информационный поиск перспективных лекарственных растений*, Наука, Ленинград (1990).
2. Я. Ганбаяр, *Монгол элийн жорын гарын авлагга*, БИТ СЕРВИС ХХК-ийн хэвлэх уйлдвэрт хэвлэв, Улаанбаатар (2001 он). (на монг. яз.).
3. *Тибетский чжор — новый сборник рецептов*, Тиб. народное изд-во, Лхаса (1975).

4. С. Я. Соколов, И. П. Замотаев, *Справочник по лекарственным растениям*, Медицина, Москва (1988).
5. А. Л. Буданцев, Е. Е. Лесновская (ред.), *Дикорастущие полезные растения России*, Изд-во СПХФА, Санкт-Петербург (2001), сс. 104 – 106, 418 – 420, 438 – 440, 557 – 558.
6. П. Д. Соколов (ред.), *Растительные ресурсы СССР: цветковые растения, их химический состав, использование; семейство Asteraceae (Compositae)*, Наука, Санкт-Петербург (1993), сс. 130 – 133.
7. В. И. Машанов, А. А. Покровский, *Пряноароматические растения*, Агропромиздат, Москва (1991), сс. 263 – 265.
8. *Государственная Фармакопея СССР. Общие методы анализа*, Т. 1, Медицина, Москва (1987), сс. 290 – 295.
9. В. В. Николаевский, А. Е. Еременко, И. К. Иванов, *Биологическая активность эфирных масел*, Медицина, Москва (1987).
10. А. А. Подколзин, В. И. Донцов, *Иммунитет и микроэлементы*, Аламанда, Москва (1994).
11. Р. В. Петров, Р. М. Хаитов, Л. Н. Чередеев и др., *Иммуномодуляторы*, Медицина, Москва (1987), сс. 9 – 10.
12. А. J. Cunningham, *Nature*, **207**(5001), 1106 – 1107 (1965).
13. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Наука, Ленинград (1963).
14. J. Kraus and G. Franz, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**(2), 314 – 317 (1992).
15. О. Д. Барнаулов, М. Л. Пospelова, С. О. Барнаулова и др., *Пряности: Лечебные свойства, медицинское использование*, Медицина, Москва (1999).
16. С. А. Москаленко, *Тез. докл. рабоч. совещания "Иммуномодуляторы природного происхождения"*, Владивосток (1990), сс. 25 – 26.

Поступила 26.04.04

DEVELOPMENT AND STUDY OF THE NEW MIXED PREPARATION IMMUNOFYT CREATED USING PRESCRIPTIONS OF TIBETAN MEDICINE

I. G. Nikolaeva, V. B. Khobrakova, S. M. Batorova, G. G. Nikolaeva, S. M. Nikolaev, A. G. Gorshkov, A. L. Vereshchagin, K. V. Par'eva, H. P. Mongolov

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

The new mixed preparation immunofyt has been created based on the prescriptions of Tibetan medicine, and the composition of an essential oil isolated from this mixture has been studied. The composition of microelements in the initial mixture and in an aqueous alcohol extract has been determined. Experiments on CBA and F1 (CBA × C57B1/6) mice showed immunomodulant activity of immunofyt in immunodepressed state induced by azathioprine.