

© Е.А.Вичкуткина, В.М.Брюханов, Я.Ф.Зверев, В.В.Лампатов, 2006
УДК 616.61-08.32-092.4

Е.А. Вичкуткина, В.М. Брюханов, Я.Ф. Зверев, В.В. Лампатов

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЧЕЧНОГО ФИТОСБОРА, СОЗДАННОГО С ПОМОЩЬЮ ОРИГИНАЛЬНОГО МЕТОДОЛОГИЧЕСКОГО ПОДХОДА

E.A. Vichkutkina, V.M. Bryukhanov, Ya.F. Zverev, V.V. Lampatov

PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF A RENAL HERBAL PRODUCT MADE BY AN ORIGINAL METHODOLOGICAL APPROACH

Кафедра фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучение фармакологических свойств почечного фитосбора, составленного на основе оригинального методологического подхода к созданию комплексных фитопрепаратов. Подход подразумевает сочетание лекарственных растений с учетом содержания в них биологически активных веществ (БАВ). **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Фармакологические свойства отвара из фитосбора изучали в экспериментах на крысах при длительном его введении. О влиянии на функцию почек судили по суточному диурезу и экскреции с мочой креатинина, натрия и калия. Противовоспалительные свойства оценивали на моделях каррагининового отека лап крыс и хлопчатобумажной гранулемы. Об антиоксидантной активности судили по показателям антиоксидантной и прооксидантной активности в условиях формалинового отека задних лап крыс. Антимикробную активность отвара из сбора определяли по модифицированной методике ГФ XI издания. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** В результате изучения фитосбора выявлено наличие у него способности усиливать мочеотделение, уменьшать интенсивность острой и хронической воспалительной реакции, влиять на процессы свободно-радикального окисления, подавлять развитие грамположительной и грамотрицательной патогенной микрофлоры. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Результаты фармакологических и микробиологических исследований позволяют считать оригинальный фитосбор перспективным средством для профилактики и лечения воспалительных заболеваний почек, обладающим высокой эффективностью и комплексным действием в эксперименте. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использованного подхода к созданию фитосборов.

Ключевые слова: фитосбор, химический состав, фармакологическая активность.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study pharmacological properties of a renal herbal product made on the basis of an original methodological approach to creation of complex phytomedicines. The access means a combination of herbals with special reference to biologically active substances (BAS) found in them. **MATERIALS AND METHODS.** The pharmacological properties of the decoction of these herbals were studied in experiments in rats given the decoction for a long time. The effects on the kidney functions were estimated by the diurnal diuresis and excretion with urine of creatinine, sodium and potassium. Antiinflammatory properties were estimated on models of carraginin edema of the rats' pads and cotton granulomas. Antioxidant activity was estimated by the indices of the antioxidant and prooxidant activity under conditions of the formalin edema of the rats' hind pads. Antimicrobial activity of the herbal decoction was determined by a modified technique of St.Ph. XIth edition. **RESULTS.** An analysis of the herbal product has established its ability to increase urination, reduce the intensity of acute and chronic inflammatory reaction, influence the processes of free radical oxidation and suppress the development of gram-positive and gram-negative pathogenic microflora. **CONCLUSION.** The results of pharmacological and microbiological investigations have shown that the original herbal product can be considered a perspective means for prophylactics and treatment of inflammatory diseases of the kidneys due to its high effectiveness and complex action in experiments. The approach used is shown to be perspective in making herbal mixtures.

Key words: herbals, chemical composition, pharmacological activity.

ВВЕДЕНИЕ

Комплексные фитопрепараты для лечения воспалительных заболеваний почек создаются, как правило, эмпирически путем комбинирования лекарственных растений с учетом их предполагаемой фармакологической активности [1,2]. Такой подход, однако, не всегда позволяет получить фитосборы с желаемым фармакотерапевтическим

эффектом. Так, скрининговые фармакологические исследования 7 комбинаций лекарственных растений Алтайского края показали, что только две из них могут быть рекомендованы для углубленного изучения как потенциальные средства терапии почечных заболеваний [3, 4].

Было решено применить принципиально иной методологический подход к созданию комплекс-

ного фитопрепарата, исходя из предварительного определения в его будущих компонентах основных групп биологически активных веществ (БАВ), прямо или косвенно участвующих в желаемых фармакологических эффектах. Не исключено, что в будущем это позволит избежать больших затрат труда и времени, необходимых для проведения скрининговых фармакологических исследований.

В настоящей работе были изучены фармакологические свойства фитосбора, созданного на основе такого подхода.

В состав оригинального сбора вошли листья грушанки круглолистной, как сырье с высоким содержанием арбутина, плоды малины обыкновенной, содержащие салициловую и другие органические кислоты, трава володушки многожилчатой, обладающая высоким содержанием флавоноидов, трава Melissa лекарственной, содержащая оксикоричные кислоты и трава тысячелистника обыкновенного, как сырье, содержащее флавоноиды, салициловую кислоту и оксикоричные кислоты. О значимости вышеперечисленных биологически активных веществ судили, исходя из проведенного нами анализа зависимости фармакологического действия названных растений от определенного их химического состава. Для анализа использовали полученные ранее в нашей лаборатории данные о противовоспалительных, антиоксидантных, противомикробных и диуретических свойствах водных извлечений из листьев грушанки круглолистной, ортисии однобокой, зимолюбки зонтичной и пяти сборов из лекарственных растений Алтайского края [3,5]. Применение современного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для количественного фитохимического анализа водных извлечений из указанных растений и сборов позволило выявить ряд химико-фармакологических закономерностей [6–8].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для изучения фармакологических свойств из фитосбора получали отвар в соотношении 1:10 в соответствии с требованиями ГФ XI.

Исследование фармакологической активности отвара из сбора проводили в условиях хронического эксперимента на белых беспородных крысах обоего пола массой 150 – 250 г. Отвар из сбора вводили внутривентрикулярно в дозе 0,5 г/кг в сутки. Животные содержались в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе и свободном доступе к воде и пище.

При исследовании влияния сбора на функцию почек животные содержались в индивидуальных клетках, что позволяет определять суточный диу-

рез. В собранной моче определяли содержание ионов Na^+ и K^+ методом пламенной фотометрии. Экскрецию креатинина как показателя, характеризующего скорость клубочковой фильтрации, определяли унифицированным методом Поппера по реакции Яффе. Отвар вводили в течение 14 дней. Полученные результаты сравнивали с исходными показателями, которые определяли до введения отвара.

Противовоспалительную активность определяли на экспериментальных моделях острого и хронического воспаления. Моделью острого воспаления служил каррагениновый отек задних лап крыс. В течение 14 дней крысам подопытной группы вводили отвар исследуемого сбора, контрольной группе – равнообъемное количество воды. После окончания длительного введения крысам, находящимся под легким эфирным наркозом, тонкой иглой под плантарный апоневроз правой задней конечности вводили 0,1 мл 1% раствора каррагенина. Объем лапы определяли онкометрически с помощью плетизмометра до и через 60, 120 и 240 минут после введения флогистика. Противовоспалительную активность рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{P_k - P_o}{P_k};$$

где A – противовоспалительная активность;

P_o – прирост объема конечности в опыте;

P_k – прирост объема конечности в контроле.

Влияние сбора на развитие пролиферативного воспаления изучали на модели хлопчатобумажной гранулемы. Крысам, находившимся под эфирным наркозом, имплантировали стерильные хлопчатобумажные шарики массой 20 мг. В течение 14 дней подопытной группе животных вводили отвар сбора, контрольной группе – равное по объему количество воды. Затем гранулемы извлекали и определяли их влажную и сухую массы. Величина прироста массы шариков служила показателем степени развития гранулематозной ткани. Разность между влажной и сухой массой оценивалась как экссудативный компонент воспалительной реакции.

Для определения антиоксидантной активности исследуемого сбора использовали разработанную в нашей лаборатории модель активации свободно-радикального окисления, индуцированного формалиновым отеком обеих задних лап крыс. Экспериментальным животным в течение 14 дней вводили отвар исследуемого сбора. Контрольной группе крыс вводили эквивалентное количество воды. По окончании введения крысам, находившимся под легким эфирным наркозом, под плантарный апоневроз обеих задних конечностей

вводили по 0,2 мл 3% раствора формалина. На третьи сутки проводили эвтаназию животных с забором крови. Плазму крови использовали для определения показателей оксидантного статуса. В гемолизате эритроцитов определяли показатели антиоксидантной активности.

Антиоксидантный статус крови крыс оценивали по активности трех важнейших внутриэритроцитарных антиоксидантных энзимов: каталазы (КАТ), супероксиддисмутаза (СОД) и глутатионпероксидазы (ГПО). Также определяли суммарный показатель общей антиоксидантной активности (ОАА), отражающий активность не только внутриклеточных антиоксидантных энзимов, но и неферментных антиоксидантов организма.

Состояние оксидантного статуса оценивали по уровню растворенных в жидкой части крови свободно-радикальных прооксидантов (общая прооксидантная активность плазмы, ОПА), индуцирующих окисление ТВИН-80. Кроме того, о состоянии оксидантного статуса судили по содержанию тиобарбитуратреактивных продуктов (ТБРП), представленных преимущественно малоновым диальдегидом.

Антимикробную активность отвара из сбора определяли по модифицированной методике ГФ XI издания в соответствии с изменениями № 2 от 29.10.2001 г в отношении стандартных тест-штаммов *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*. Стандартные тест-штаммы микроорганизмов были получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

К концентрированным отварам, помещенным в питательную среду, добавляли штаммы микроорганизмов и инкубировали в течение двух суток. В контроле вместо концентрированного отвара использовали физиологический раствор. Наличие или отсутствие роста микроорганизмов оценивали визуально после высева на твердую питательную среду и суточной инкубации.

Эвтаназию животных производили, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к при-

казу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755), путем дислокации шейного отдела позвонка под эфирным наркозом.

Полученные результаты обрабатывали статистическим методом вариационных рядов с использованием критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования влияния сбора на функцию почек в условиях длительного введения представлены в табл. 1. Из таблицы видно, что сбор обладает достаточно выраженными диуретическими свойствами. Так, к 5-му дню введения увеличение диуреза достигло достоверности, а к 12-му дню введения отвара из сбора диурез превысил исходный уровень более чем в 2 раза.

В первые пять дней введения увеличение диуреза у крыс происходило синхронно с ростом экскреции креатинина. Последняя, достоверно превысив исходное значение на пятый день, оставалась на достигнутом уровне в течение всех последующих дней введения отвара. Диурез же сохранял динамику роста вплоть до 12-го дня наблюдения, превысив к этому времени исходный уровень на 106%. По-видимому, это связано с уменьшением реабсорбции натрия, увеличение экскреции которого наблюдалось с 8-го дня и достигало достоверности к 12-му дню эксперимента, превысив исходный уровень на 29,2%.

Полученные результаты показывают наличие двух причин мочегонного действия сбора. С одной стороны – это усиление фильтрации, что, очевидно, обеспечивало постепенное увеличение диуреза, начиная с первых дней введения отвара, с другой – угнетение реабсорбции натрия в почечных канальцах, что, в свою очередь, обуславливало развитие натрийуреза и дальнейшее увеличение экскреции воды.

Достигнутый уровень диуреза, а также экскреции креатинина и ионов натрия сохранялся и после прекращения введения отвара.

Что касается экскреции ионов калия, то ее увеличение при введении сбора наблюдалось лишь в

Таблица 1

Влияние длительного введения отвара из сбора на функцию почек у крыс

Показатели функции почек	Исходный уровень	Дни введения отвара							Через 1 день после окончания введения
		1	3	5	8	10	12	14	
Диурез (мл)	6,7±0,46	7,8±0,72	8,2±0,86	9,4±1,19*	10,4±1,28*	13,3±1,44*	13,8±1,70*	12,0±1,62*	12,9±1,51*
Na ⁺ (мкМ)	30,8±2,18	43,6±5,64*	25,1±3,15	26,3±2,81	27,9±3,48	36,3±3,27	39,8±3,21*	39,4±3,55*	41,6±4,86*
K ⁺ (мкМ)	550,1±37,2	644,9±70,4	648,4±76,8	567,4±63,8	616,9±59,8	694,3±75,4	647,7±60,3	635,6±74,6	648,4±63,3
Креатинин (мкМ)	22,7±2,23	26,7±2,68	30,3±3,41	36,4±3,56*	35,0±4,11*	36,3±4,05*	30,7±4,12	35,4±6,03*	33,9±4,93*

Примечание: звездочками отмечены достоверные изменения по отношению к исходному уровню.

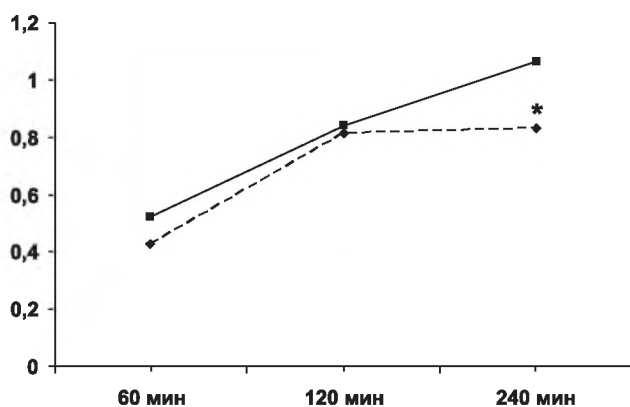


Рисунок. Влияние отвара из сбора на развитие острого воспаления. По оси абсцисс – время наблюдения, мин. По оси ординат – прирост объема лап крыс, см³. Сплошная линия соответствует контрольной группе крыс, пунктирная – опытной. Звездочкой отмечено достоверное различие.

виде тенденции, так и не достигнув достоверных. Учитывая, что потеря ионов калия нежелательна для организма, отсутствие выраженного калийуреза следует рассматривать как несомненное преимущество растительного сбора перед большинством синтетических мочегонных средств.

Противовоспалительная активность изученного сбора при его длительном профилактическом введении в опытах с моделированием острого воспалительного процесса представлена на рисунке. Как видно на рисунке, субплантарное введение каррагенина контрольной группе животных привело к быстрому формированию отека конечности. Уже через 60 минут после инъекции флогистика объем лапы превосходил исходный уровень в среднем на 0,52 см³, что соответствует приросту в 42,1%. В дальнейшем объем конечности последовательно увеличивался, достигнув максимального значения к 240-й минуте. К этому времени прирост составил 1,06 см³, что соответствует увеличению объема конечности почти вдвое.

У крыс, получавших сбор, через 60 минут после введения флогистика прирост объема конечностей составил в среднем 0,43 см³, что на 17,3% меньше соответствующего прироста в контроле. К концу периода наблюдения различия становились более значимыми и приобрели достоверность. Так, к 240-й минуте прирост объема лап крыс, получав-

ших сбор, составил всего 0,83 см³, что на 21,7% ниже контрольного показателя ($P=0,001$).

Таким образом, предварительное введение сбора животным повлияло как на интенсивность воспалительного отека, так и на динамику его развития.

При исследовании влияния на течение хронического воспалительного процесса выяснилось, что изученный сбор обладает антипролиферативным действием. В контрольной группе животных сформировалась воспалительная гранулема средней массой 84,6 мг, после высушивания масса гранулемы уменьшилась на 69,9 мг и составила 14,7 мг.

В результате профилактического введения сбора животным подопытной группы выявилось существенное уменьшение влажной массы воспалительной гранулемы, которая составила в среднем 70,5 мг, что на 16,7% ниже контрольного показателя и явилось достоверным различием ($P<0,001$). Достоверным оказалось и снижение массы сухой гранулемы, которое составило 19% ($P<0,001$). Разность между влажной и сухой массами составила 58,6 мг и оказалась на 16,2% ниже соответствующего показателя экссудации контрольной группы животных.

Полученные результаты свидетельствуют о влиянии сбора, как на экссудативный, так и на пролиферативный компоненты воспалительного процесса.

Результаты исследования антиоксидантной активности сбора показаны в табл. 2. Как следует из таблицы, на третий день после введения флогистика в контрольной группе животных наблюдалось достоверное увеличение показателей как оксидантного, так и антиоксидантного статуса по отношению к соответствующим показателям интактных животных. Как показано ранее, воспалительный процесс провоцирует увеличение продукции свободных радикалов в организме, что в последующем приводит к компенсаторной активации ферментативной антиоксидантной защиты, а также увеличению показателя ОАА крови крыс.

В подопытной группе животных под влиянием сбора наблюдалось достоверное уменьшение показателей антиоксидантной системы крови крыс по отношению к контролю. Так, активность ката-

Таблица 2

Влияние оригинального сбора на антиоксидантную и прооксидантную активность крови крыс на фоне формалинового воспаления

Группа подопытных животных	ТБРП, мкМ	ОПА, %	Каталаза, %	СОД, %	ГПО, ЕД/мг Hb	ОАА, %
Интактные крысы	2,5±0,18	45,1±1,06	12,2±1,27	16,9±0,81	233,2±7,25	73,7±0,51
Контрольные крысы	<u>3,4±0,17</u>	<u>48,9±1,18</u>	<u>22,4±1,02</u>	<u>28,3±1,05</u>	242,8±11,2	<u>87,8±0,86</u>
Подопытные крысы	<u>7,3±0,77*</u>	<u>60,4±0,85*</u>	<u>20,0±0,5*</u>	<u>22,3±0,57*</u>	<u>212,0±5,74*</u>	<u>44,2±0,77*</u>

Примечание: звездочками отмечены достоверные различия с контрольной группой животных. Подчеркнуты достоверные различия с интактной группой животных.

Противомикробная активность сгущенного отвара из сбора

Таблица 3

Тест-микроорганизмы	Концентрация сгущенного отвара, %			
	10	5	2,5	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+

Примечание: «-» - отсутствие роста, «+» - наличие роста.

лазы уменьшилась на 10,7%, супероксиддисмутаза – на 17,7%, глутатионпероксидаза – на 12,7%. При этом наибольшие изменения произошли с интегративным показателем ОАА, значение которого оказалось на 49,7% меньше соответствующего показателя в контроле и даже на 40% ниже показателя интактной группы животных. Снижение указанных показателей антиоксидантного статуса, по-видимому, произошло в ответ на уменьшение продукции свободных радикалов под влиянием биологически активных веществ сбора, что следует рассматривать как антиоксидантное действие.

Показатели оксидантного статуса подопытной группы животных при этом несколько превысили контрольные значения, что, вероятно, явилось следствием упомянутого выше снижения активности антиоксидантных ферментов.

Таким образом, под влиянием сбора произошли существенные изменения в балансе между оксидантной и антиоксидантной системами в организме животных. Возможно, это имеет отношение к механизмам противовоспалительного действия исследованного сбора.

Результаты микробиологических исследований (табл. 3) показали, что отвар из исследованного сбора обладает противомикробной активностью в отношении золотистого стафилококка в нативном виде (соответствует 10%-ному сгущенному отвару), а также при разведении в 2 и 4 раза (соответственно 5% и 2,5%-ные сгущенные отвары). Кроме того, выявлена чувствительность к исследуемому отвару синегнойной палочки, подавление роста которой отмечалось при использовании 10%-ного сгущенного отвара, что соответствует концентрации действующих биологически активных веществ в нативном отваре. Чувствительность кишечной палочки в данном исследовании не выявлена.

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований показано, что сбор, созданный на основе предлагаемого оригинального методологического подхода к созданию комплексных фитопрепаратов, при длительном применении эффективно подавляет развитие остро-

го и хронического воспалительного процесса, влияя при этом как на экссудативный, так и на пролиферативный его компоненты. Одним из возможных механизмов противовоспалительного действия отвара из сбора является его выраженное влияние на процессы свободно-радикального окисления, наличие которого установлено в опытах *in vivo*. Кроме того, важным представляется наличие противомикробных свойств в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, что было показано в микробиологических исследованиях. Перечисленные свойства, как и установленное диуретическое действие изученного сбора, являются полезными свойствами для осуществления мягкой, длительной коррекции воспалительных заболеваний мочевыводящей системы. При этом важно отметить, что сбор, созданный на основе предлагаемого методологического подхода, отличается от ранее исследованных именно сочетанием выраженных и необходимых в данной ситуации фармакологических свойств. Так, среди ранее изученных композиций, путем скрининговых фармакологических исследований были выявлены сборы с интенсивным диуретическим действием, однако их противовоспалительные свойства выражены незначительно. Другие сборы, обладали хорошим противовоспалительным действием, но их диуретическое действие было весьма слабым [3, 9].

С помощью предлагаемого подхода нам удалось создать фитокомпозицию, обладающую комплексным действием. Это оказалось возможным благодаря сочетанию биологически активных соединений, прямо или косвенно влияющих на фармакологическую активность фитопрепаратов. В предварительном химико-фармакологическом анализе было установлено, что растения и сборы с высоким содержанием арбутина, флавоноидов и салициловой кислоты обладают лучшими противовоспалительными свойствами, флавоноидов и оксикоричных кислот – антиоксидантными. Для наличия противомикробных свойств, по-видимому, необходимо высокое содержание суммы всех фенольных соединений, а диуретические свойства определяются наличием флавоноидов и арбутина. Растения, вошедшие в состав оригинального почечного сбора, подобраны таким образом, чтобы создать в водном извлечении из сбора высокие концентрации всех перечисленных соединений. При этом важную роль играет не только количество БАВ, но и их соотношение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выраженная противовоспалительная активность, способность влиять на свободно-радикаль-

ные процессы в организме, подавлять развитие патогенной микрофлоры и усиливать мочеотделительную функцию почек позволяют считать предложенный почечный сбор перспективным для углубленного исследования в качестве средства профилактики и лечения воспалительных заболеваний почек. Полученные результаты показывают эффективность использованного подхода к созданию фитосбора.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Турищев СН. *Фитотерапия*. Академия, М., 2003; 148 - 155
2. Гажев БН, Виноградова ТА. *Лечение болезней почек и мочевыводящих путей*. Аспект, СПб., 1996; 6-17
3. Кривова ОШ. *Фармакологическая активность сборов лекарственных растений из флоры Алтая и их влияние на функцию почек*. Автореф. дисс. ... канд. биологических наук. Барнаул, 2001; 26
4. Санаров ЕМ, Брюханов ВМ, Зверев ЯФ. Сборы лекарственных растений в лечении экспериментальной патологии почек. *Нефрология и диализ* 2003;(3): 241
5. Пензина ТН, Брюханов ВМ, Зверев ЯФ. *Перспективы использования отваров листьев ортилии, грушанки и зимилюбки при воспалительных заболеваниях почек*. В: Ле-

карственные растения Алтая: от эксперимента к клиническому применению: Сборник материалов научно-практической конференции АГМУ и Фармацевтической компании «Эвалар». Выпуск 1. Барнаул, 2004; 53-64

6. Вичкуткина ЕА, Брюханов ВМ, Зверев ЯФ и др. *Содержание фенольных соединений в водных и спиртовых извлечениях из листьев растений семейства Грушанковых*. В: Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: Материалы II Всероссийской конференции. Барнаул, 2005; 325-330

7. Вичкуткина ЕА, Замятина СВ, Брюханов ВМ и др. *Антиоксидантная активность как атрибут противовоспалительного действия некоторых сборов лекарственных растений (поиск зависимости от химического состава)*. В: Юбилейный сборник научных статей. Барнаул, 2005; 41-54

8. Вичкуткина ЕА, Брюханов ВМ, Зверев ЯФ и др. *Определение количественного содержания арбутина в водных извлечениях из сборов лекарственных растений Алтая методом ВЭЖХ*. В: Современные проблемы фармакологии и фармации: Сб. материалов Всероссийской науч.-практич. конференции НГМА. Новосибирск, 2005; 2-5

9. Санаров ЕМ, Брюханов ВМ, Зверев ЯВ. *Фармакогностическая характеристика и фармакологическая активность сборов из лекарственных растений флоры Алтая*. В: Лекарственные растения Алтая: от эксперимента к клиническому применению: Сборник материалов научно-практической конференции АГМУ и Фармацевтической компании «Эвалар». Выпуск 1. Барнаул, 2004; 83-97

Поступила в редакцию 24.04.2006 г.