

Л. П. Коваленко¹, В. В. Балакшин², Г. А. Преснова², А. Н. Чистяков²,
Е. В. Шипаева¹, С. В. Алексеева¹, А. Д. Дурнев¹

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОТОКСИЧНОСТИ И АЛЛЕРГЕННОСТИ ЭКСТРАКТА БЕРЕСТЫ СУХОГО, СОДЕРЖАЩЕГО БЕТУЛИН

¹ ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН

² ООО "Березовый мир", Москва

В результате проведенного комплексного исследования на мышах и морских свинках установлено, что экстракт бересты сухой (БЭС) с содержанием бетулина не менее 70 %, применяемый перорально, в дозах 100 и 1000 мг/кг, не обладает иммунотоксическими и аллергизирующими свойствами. БЭС в дозе 100 мг/кг при 14-ти дневном пероральном введении уменьшает образование нейтрофилами мышей активных форм кислорода в тесте люминолзависимой хемилюминесценции, а при однократном введении в дозах 100 мг/кг и 1000 мг/кг ингибирует реакцию воспаления на Кон А у мышей. Введение БЭС морским свинкам в дозах 100 мг/кг и 1000 мг/кг подавляет интенсивность реакции системной анафилаксии.

Растительные экстракты находят широкое применение в качестве биологически активных добавок (БАД) и лекарственных средств [1].

Недавно был предложен оригинальный способ получения бересты экстракта сухого с содержанием бетулина не менее 70 % (БЭС), который обладает широким спектром фармакологической активности, в частности, противовоспалительными свойствами [2 – 5].

Данное наблюдение, а также позитивный опыт применения БЭС в качестве БАД, определили перспективу разработки на его основе противовоспалительного лекарственного средства.

Одним из этапов этой работы явилось комплексное изучение аллергизирующих и иммунотоксических свойств БЭС.

Материалы и методы

Бересты экстракт сухой (БЭС), производства ООО "Березовый мир" (Регистрационный номер СЭЗ № 77.99.03.936.Б.000201.02.04), с содержанием бетулина не менее 70 %, был получен экстрагированием верхнего слоя коры березы органическими растворителями с дальнейшей очисткой в чистом этиловом спирте.

Изучение иммунотоксичности и аллергизирующих свойств БЭС проводили согласно методическим указаниям, утвержденным Фармакологическим комитетом МЗ РФ 2000 г [6]. Эксперименты выполняли на мышах самцах линий СВА, С57BL/6 и гибридах F₁ (СВА × С57BL/6) массой 18 – 20 г и самцах морских свинок альбиносов, массой 250 – 300 г (питомник "Столбовая" РАМН). Животных содержали в виварии ГУ НИИ фармакологии РАМН в условиях, соответствующих действующим Санитарным правилам, со свободным доступом к воде и пище.

В экспериментах по изучению иммунотоксичности БЭС вводили перорально 14 дней в терапевтически эффективной дозе 100 мг/кг [7] и в дозе на порядок ее превышающей — 1000 мг/кг в 1 % крахмальном геле, животным контрольной группы вводили соответствующий объем геля.

Влияние БЭС на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов (с использованием частиц коллоидной туши), массу и клеточность тимуса, селезенки, подколенных лимфоузлов изучали по стандартным методикам на мышах гибридах F₁ (СВА × С57BL/6). Для определения влияния двухнедельного введения БЭС на активность нейтрофилов в тесте хемилюми-

Таблица 1
Показатели хемилюминесцентного ответа нейтрофилов, стимулированных зимозаном, при пероральном введении БЭС в течение 14 дней

Доза БЭС	ΔI , (мВ)	Уровень значимости	S, (ед.)	Уровень значимости
Контроль (n = 9)	38,0 ± 12,1	—	23475,8 ± 6509,3	—
14-ти дневное п/о введение 100 мг/кг (n = 10)	11,5 ± 2,7	p < 0,05	7057,2 ± 1408,0	p < 0,01
14-ти дневное п/о введение 1000 мг/кг (n = 10)	82,0 ± 19,7	p > 0,05	52140,2 ± 13716,0	p > 0,05

Примечание: n — количество животных; ΔI — показатель уровня активированной хемилюминесценции; S — светосумма хемилюминесценции за 20 мин после добавления зимозана.

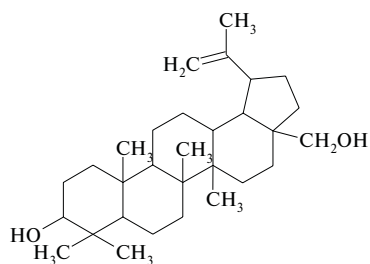


Рис. 1. Структура бетулина. Молекулярная формула: $C_{30}H_{50}O_2$

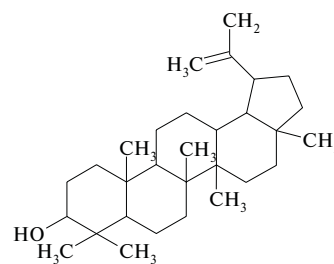


Рис. 2. Структура лулеоло. Молекулярная формула: $C_{30}H_{50}O$

несценции, клетки выделяли по методу, разработанному фирмой Sigma, из гепаринизированной крови мышей гибридов F_1 (СВА \times С57В1/6). Хемиллюминесценцию, стимулированную опсонизированным зимозаном (концентрация в пробе — 100 мкг/мл), регистрировали на хемиллюминиметре Bioorbit 1251 (Швеция).

Влияние БЭС на гуморальный иммунитет после 14-дневного введения определяли по титрам гемагглютининов в реакции гемагглютинации (РПГА), поставленной в микротитраторе Такачи, в опытах на мышцах линий СВА и С57В1/6. Клеточный иммунный ответ изучали по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в опытах на мышцах гибридах F_1 (СВА \times С57В1/6).

Для постановки реакции общей анафилаксии использовали модель сенсibilизации интактных морских свинок 0,6 % раствором белка куриного яйца (БКЯ, основной аллергенный компонент — овальбумин) [8]. Влияние экстракта на конканавалин А (Кон А)-индуцированную реакцию воспаления изучали на мышцах линии СВА. Наличие аллергических реакций замедленного типа к БЭС при однократном субплантарном введении препарата в 2 дозах в смеси с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) определяли после внутрикожного (в/к) введения разрешающей дозы экстракта на выстриженных участках спины морских свинок альбиносов на 21 день опыта.

Статистический анализ данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента, используя статистические программы (PSP) STATISTICA (версия 6.0) для WINDOWS.

Результаты и их обсуждение

Введение БЭС *per os* в дозах 100 и 1000 мг/кг в течение 14 дней практически не влияло на массу и кле-

точность исследованных органов иммунной системы: селезенки, тимуса и лимфоузлов. Только при использовании БЭС в дозе 100 мг/кг отмечено увеличение массы селезенки на 22 % ($p < 0,01$).

Двухнедельное пероральное введение экстракта в дозе 100 мг/кг вызывало выраженное подавление (в 3,3 раза) образования активных форм кислорода нейтрофилами мышей в тесте хемиллюминесценции (табл. 1). Введение БЭС мышам в дозах 100 и 1000 мг/кг в течение 14 дней не вызвало значимого изменения фагоцитарного индекса и не влияло на регистрируемые показатели клеточного иммунитета.

Курсовое введение экстракта в дозе 100 мг/кг стимулировало антителообразование на 11,6 % у мышей линии СВА по сравнению с контрольной группой животных (табл. 2). БЭС в дозе 1000 мг/кг не вызывал изменения антителообразования у мышей линий СВА и С57В1/6.

Введение БЭС в дозах 100 и 1000 мг/кг подавляло интенсивность системной реакции анафилаксии. Индекс реакции по Weigle в контрольной группе составил 2,0; при введении бетулина в дозе 100 мг/кг — 1,1; при введении в дозе 1000 мг/кг — 1,3. Аллергических реакций замедленного типа при иммунизации морских свинок БЭС в дозах 100 и 1000 мг/кг в смеси с полным адьювантом Фрейнда также не выявлено. Однократное введение экстракта бересты *per os* в дозах 100 и 1000 мг/кг мышам линии СВА вызывало выраженное подавление реакции воспаления на Кон А на 51,8 и 36,8 % соответственно (табл. 3).

Таким образом, в результате проведенного комплексного исследования на мышцах различных линий и морских свинках альбиносах установлено, что экстракт бересты сухой, с содержанием бетулина не менее 70 %, применяемый перорально, в дозах 100 и 1000 мг/кг, не обладает иммунотоксическим действием и аллергизирующими свойствами. Кроме того, по-

Таблица 2
Влияние введения БЭС *per os* в течение 14 дней на гуморальный иммунитет (РПГА)

Группа мышей	Мыши линии СВА	Мыши линии С57В1/6
Контроль	9,13 \pm 0,35, $n = 9$	7,17 \pm 0,48, $n = 10$
БЭС 100 мг/кг	10,57 \pm 0,20*, $n = 10$	7,10 \pm 0,48, $n = 10$
БЭС 1000 мг/кг	9,00 \pm 0,22, $n = 9$	6,38 \pm 0,46, $n = 9$

Примечание: В таблице представлены средние величины титра антител в \log_2 ; n — число животных в группе; * — $p < 0,01$.

Таблица 3
Влияние БЭС на реакцию воспаления на Кон А

Доза БЭС, мг/кг	Число животных в группе	Индекс реакции
Контроль	9	17,1 \pm 1,9
БЭС:		
100 мг/кг	9	8,2 \pm 2,6 ($p < 0,01$)
1000 мг/кг	9	10,8 \pm 2,1 ($p < 0,05$)

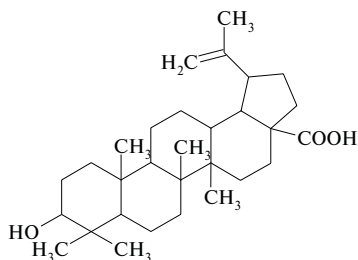


Рис. 3. Структура бетулиновой кислоты. Молекулярная формула: $C_{30}H_{48}O_3$

лученные данные указывают на наличие у БЭС, при введении его в терапевтически эффективной дозе 100 мг/кг, антиоксидантных и противовоспалительных свойств.

Полученные данные согласуются с литературными данными. Основным действующим началом бересты экстракта сухого предположительно является пентациклический тритерпеновый спирт $C_{30}H_{50}O_2$ бетулин (бетулинол, $C_{30}H_{50}O_2$, рис. 1). По данным литературы бетулин обладает выраженными антиоксидантными, противовоспалительными и противоопухолевыми свойствами (2–5). Противовоспалительная активность БЭС может быть обусловлена тем, что его компоненты, бетулин и бетулиновая кислота, могут являться потенциальными ингибиторами фосфолипазы A_2 [9]. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства присущи содержащемуся в БЭС люпеолу ($C_{30}H_{50}O$, рис. 2), который в экстракте коры березы составляет примерно 10 % от содержания бетулина, бетулиновой кислоте ($C_{30}H_{48}O_3$, рис. 3) и другим минорным компонентам тритерпеноидной фракции бересты [10–12].

По данным литературы, селективная стимуляция Th_1 -хелперов, вырабатывающих интерферон γ , (IFN- γ), задерживает выработку Th_2 -клеток, секретирующих интерлейкин IL 4, стимулирующий синтез IgE-антител у мышей [13]. Возможно, что подавление системной реакции анафилаксии у морских свинок связано с выявленной у БЭС способностью селективно индуцировать γ -интерферон и таким образом тормозить выработку Th_2 хелперов [14]. Наличие противоаллергенных свойств у экстракта бересты сухого требует дальнейшего изучения.

Таким образом, результаты проведенного исследования, с одной стороны, указывают, что БЭС не обладает нежелательными иммунотоксической и алергизирующей активностями, а с другой, определяет перспективу его дальнейшего изучения в качестве противоаллергенного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. В. Пастушенков, Е. Е. Лесиовская, *Фармакотерапия с основами фитотерапии*, часть 2, СПХФИ, Санкт-Петербург (1995), сс. 206–216.
2. Ю. К. Василенко, В. Ф. Семенченко, Л. М. Фролова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **56**(4), 53–55 (1993).
3. П. Г. Дерябин, Е. И. Исаева, Д. К. Львов, В. В. Балакшин, *Новые лекарства*, № 9–10, 50–51 (2003).
4. Л. Т. Карачурина, Т. А. Сапожникова, Ф. С. Зарудий и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **66**(4), 56–59 (2003).
5. K. Yamashita, H. Lu, J. Lu, et al., *Clin Chim Acta*, **325**(1–2), 91–96 (2002).
6. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, ред. — В. П. Фисенко, ИИА “Ремедиум”, Москва, (2000), сс. 25–38.
7. P. G. Deryabin, A. N. Chistyakov, G. A. Presnova, et al., *Milan, Pharma Chem*, march, 22–24 (2003).
8. Т. Г. Хлопушина, А. В. Кринская, Л. П. Коваленко и др., *Бюл. экспер. биол. и мед.*, № 7, 67–69 (1991).
9. P. Bernard, T. Scior, B. Didier, et al., *Phytochemistry*, **58**(6), 865–874 (2001).
10. A. Shirwaikar, M. Setty, P. Bommu, *Indian J. Exp. Biol.*, **42**(7), 686–690 (2004).
11. S. Sultana, M. Saleem, S. Sharma, N. Khan, *Indian J. Exp. Biol.*, **41**(8), 827–831 (2003).
12. A. A. Ramirez, A. L. Perez-Castorena, A. R. de Vivar, *Z. Naturforsch.*, **59**(3–4), 237–243 (2004).
13. I. Kimber, N. I. Kerkvliet, S. L. Taylor, et al., *Toxicol. Sci.*, **48**(2), 157–162 (1999).
14. П. Г. Дерябин, Н. Н. Носик, Е. И. Исаева и др., *Вопросы вирусологии РАМН*, № 5, 13–16 (2005).

Поступила 26.02.04

L. P. Kovalenko, V. V. Balakshin, G. A. Presnova,
A. N. Chistyakov, E. V. Shipaeva, S. V. Alekseeva,
A. D. Durnev

STUDY ON IMMUNOTOXICITY AND ALLERGENIC PROPERTIES OF BIRCH BARK DRY EXTRACT

1 Laboratory of Drug Toxicology (headed by professor Andrey D. Durnev) State Zakusov Research Institute of Pharmacology RAMS

(Sergey B. Seredenin, academician RAMS)

Baltiyskaya str. 8, 125315 Moscow, Russia

2 O. O. O. “Birch World”, Ozernaya str. 15, Moscow, Russia

Birch bark dry extract (BBDE) with not less than 70 % of betulin content, was tested in complex studies conducted in mice and guinea pigs. Administered perorally at doses of 100 and 1000 mg/kg it was shown to have neither immunotoxic nor allergenic properties.

In luminol-dependent chemiluminescence tests BBDE used in mice at a dose of 100 mg/kg during a 14-day therapy was found to inhibit the active oxygen species production by neutrophils. Under a single administration at doses of 100 and 1000 mg/kg BBDE suppressed Con-A-induced inflammation in mice. BBDE administered to guinea pigs at doses of 100 mg/kg and 1000 mg/kg was shown to reduce the intensity of systemic anaphylaxis.