

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИСАХАРИДНЫХ ФРАКЦИЙ ДРЕВЕСНОЙ ЗЕЛЕНИ И ШИШЕК ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ

¹Гуляев Д.К., ¹Лялина Н.В., ¹Рудакова И.П., ¹Белоногова В.Д.

ГБОУ ВПО «Пермская Государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пермь, Россия (614990, Россия, г.Пермь, ул. Полевая д.2), dkg2014@mail.ru

Проведено исследование полисахаридных фракций древесной зелени и шишек ели обыкновенной. Полисахаридные фракции получали из сырья, собранного в Ильинском районе Пермского края в 2014 г. Древесную зелень собирали в сентябре, а шишки — в июле. Первая фракция представлена водорастворимым полисахаридным комплексом, вторая представлена пектиновыми веществами. Определение группового состава углеводного комплекса древесной зелени и шишек ели обыкновенной проводили с помощью антрон-серного метода. Установлено, что в древесной зелени преобладает фракция пектиновых веществ (3,25%), а в шишках — фракция водорастворимых полисахаридов (1,55%). Результаты определения острой токсичности позволяют отнести водорастворимый полисахаридный комплекс древесной зелени и шишек к классу малотоксичных веществ ($LD_{50} > 5000$ мг/кг). Малая токсичность полученных фракций, позволяет использовать данные вещества в медицинских целях без вреда для организма. Определена противовоспалительная активность полисахаридных фракций древесной зелени и шишек ели обыкновенной. Противовоспалительную активность определяли на крысах массой 180–220 г обоего пола, на модели остро воспалительного отека, вызванного субплантарным введением в заднюю лапу крысы 1%-ного раствора каррагинина. Полисахаридные фракции показали достаточно высокую противовоспалительную активность. Самой активной оказалась фракция водорастворимых полисахаридов шишек (процент торможения 65%).

Ключевые слова: ель обыкновенная, древесная зелень, шишки, противовоспалительная активность

STUDY OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF POLYSACCHARIDE FRACTIONS OF WOODY HERBS AND CONES PICEA ABIES

¹Gulyaev D.K., ¹Lyalina N.V., ¹Rudacova I.P., Belonogova V.D.

«Perm State Pharmaceutical Academy» of the Ministry of Health of Russian Federation, Perm, Russia (614990, Perm, Russia, street Field, 2), dkg2014@mail.ru

The study polysaccharide fractions of woody herbs picea abies and cones. The polysaccharide fractions obtained from raw materials harvested in Ilyinsky district Perm Territory in 2014. Woody herb harvested in September and cones in July. The first fraction is represented by the water-soluble polysaccharide complex, the second is represented by pectins. Determination of group composition of carbohydrate complex of woody herbs and picea abies cones was carried out by anthrone-sulfuric method. It is found that woody herbs predominant fraction of pectin (3.25%), and the cone-like water-soluble polysaccharides fraction (1.55%). The results of determination of acute toxicity, allow to carry a water-soluble polysaccharide complex woody herbs and cones to the class of low toxic substances ($LD_{50} > 5000$ mg / kg). Low toxicity of the fractions obtained allows the use of these substances for medical purposes without any harm to the body. Determined anti-inflammatory activity of polysaccharide fraction of woody herbs of picea abies and cones. Anti-inflammatory activity was determined on rats weighing 180-220 g of both sexes, a model of acute inflammatory edema induced by administration in subplantary rat hind paw of 1% solution of carrageenin. Polysaccharide fraction showed relatively high anti-inflammatory activity. The most active was fraction of water-soluble polysaccharides cones (the percentage inhibition of 65%).

Keywords: Picea abies, woody herb, cones, anti-inflammatory activity

В настоящее время большое внимание уделяется изучению полисахаридов растений с перспективой их медицинского применения [4, 5, 10, 11].

Ель обыкновенная является одним из основных источников деловой древесины. На каждый кубометр древесины приходится до 500 кг отходов, основную часть их (до 250 кг) составляют древесная зелень (охвоенные ветви) и шишки. Отходы лесозаготовки, оставленные на лесосеке, приводят к снижению эффективности использования лесных

ресурсов. Древесная зелень и шишки ели обыкновенной содержат достаточно большое количество фармакологически активных веществ [1-3].

Полисахариды растительного происхождения обладают противовоспалительной активностью [9]. Противовоспалительное действие растительных полисахаридов связано с изменением проницаемости сосудистой стенки в очаге воспаления, стимуляцией фагоцитоза, ускорением процессов синтеза, активацией ферментных систем.

Целью нашего исследования является изучение острой токсичности и противовоспалительной активности полисахаридных фракций древесной зелени и шишек ели обыкновенной.

Материалы и методы

Объектами исследования служили образцы древесной зелени и шишек ели обыкновенной. Образцы древесной зелени были собраны в Ильинском районе Пермского края в сентябре 2014 г., образцы шишек — в июле 2014 г.

Полисахаридные фракции выделяли по методу Н.К. Кочеткова [7]. Навеску воздушно-сухого сырья измельчали до размера частиц диаметром 2 мм. Для удаления низкомолекулярных сахаров и фенольных соединений навеску сырья около 100 г предварительно экстрагировали спиртом 80% в соотношении 1:10 в течение 1 ч.

Из шрота после извлечения низкомолекулярных сахаров и фенольных соединений экстрагировали водорастворимый полисахаридный комплекс водой очищенной в соотношении 1:10 при температуре 80°C. Экстракцию повторяли 2 раза в тех же условиях. Объединенные экстракты упаривали под вакуумом и осаждали водорастворимый полисахаридный комплекс трехкратным количеством спирта 96%-ного.

Шрот после выделения водорастворимого полисахаридного комплекса экстрагировали в течение 1 ч смесью 0,25%-ного раствора аммония оксалата и 0,25%-ного раствора щавелевой кислоты (1:1) в соотношении 1:10. Экстракцию повторяли дважды в тех же условиях. Извлечения объединяли, упаривали под вакуумом и осаждали протопектины добавлением четырехкратного количества спирта 96%-ного. Полученные фракции очищали многократным промыванием спиртом 80%-ным.

Определение группового состава углеводного комплекса проводили по методике [8]. Для удаления низкомолекулярных сахаров и фенольных соединений навеску сырья около 10,0 г (точная навеска) предварительно экстрагировали спиртом 80%-ным в соотношении 1:10 в течение 1 ч.

Определение водорастворимого полисахаридного комплекса (ВРПК). Из шрота после спиртовой экстракции ВРПК получали экстрагированием водой очищенной дважды по 100 мл в течение 1 ч. Извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводили

до метки тем же экстрагентом (раствор А). 2 мл раствора А переносили в центрифужную пробирку, приливали 8 мл спирта 96%-ного и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения содержимое пробирки центрифугировали в течение 10 мин со скоростью вращения 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливали, а осадок продували в пробирке горячим воздухом до удаления следов этанола. К осадку приливали 4 мл 0,2%-ного раствора антраона в серной кислоте концентрированной, нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Содержимое пробирки после охлаждения переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки спиртом 96%-ным (раствор Б).

Определение пектиновых веществ. Шрот после водной экстракции обрабатывали смесью 0,5%-ных растворов кислоты щавелевой и аммония оксалата (1:1) 3 раза по 80 мл в течение 1,5 ч и далее по схеме определения водорастворимых полисахаридов.

Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре при длинах волн 424 нм (водорастворимые полисахариды), 430 нм (пектиновые вещества) в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 4 мл 0,2%-ного раствора антраона в серной кислоте концентрированной, выдержанной в тех же условиях, что и опытная смесь.

Содержание групп углеводов (X) в пересчете на арабинозу и абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \cdot K^V \cdot 0,91 \cdot 100}{m \cdot E \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность исследуемого раствора; k^V – коэффициент разбавления (2500 – водорастворимые полисахариды, 5000 – пектиновые вещества); 0,91 – коэффициент гидролиза; E – коэффициент пересчета на моносахарид (Ara – 67); m – масса навески сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Определение противовоспалительной активности проводили на крысах массой 180–220 г. обоего пола (группа включала 6 животных) на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением в заднюю лапу крысы 0,1 мл 1%-ного водного раствора каррагинина.

Увеличение объема стопы, свидетельствующее о развитии отека, оценивали онкометрически [6] до введения и через 4 ч после введения раствора каррагинина. Исследуемые вещества вводили перорально в дозе 50 мг/кг за 1 ч до введения флогогенного агента. Контролем служили животные, не получавшие препарата. Статистическую обработку проводили по методу Стьюдента.

На основе полученных результатов определяли эффект торможения в процентах к контрольному уровню. О наличии противовоспалительного действия судили по

выраженности торможения воспалительной реакции. Если этот показатель был больше 30%, результат учитывался как положительный.

Результаты и обсуждение

Таблица 1

Содержание отдельных фракций полисахаридов в древесной зелени и шишках ели обыкновенной, %

Фракция	Древесная зелень	Хвоя	Ветви	Шишки
ВРПК	0,70±0,1	2,88±0,23	0,48±0,18	1,51±0,26
Пектиновые вещества	3,25±0,18	1,99±0,12	1,25±0,25	0,98±0,11

Установлено, что в древесной зелени ели обыкновенной больше содержится пектиновых веществ, а в шишках больше ВРПК. Кроме того, были получены полисахаридные фракции отдельно из хвои и ветвей. Содержание ВРПК в хвое оказалось значительно выше, чем в той же навеске древесной зелени. Содержание пектиновых веществ, наоборот, было меньше, чем в той же навеске древесной зелени. В ветвях наблюдается похожее соотношение по содержанию полисахаридных фракций, что и в древесной зелени.

Таблица 2

Определение острой токсичности полисахаридных фракций ели обыкновенной

Фракция	LD ₅₀ , перорально (мг/кг)	Класс токсичности
ВРПК шишек	>5000	Малотоксично
Пектиновые вещества шишек	3250	Малотоксично
ВРПК древесной зелени	>5000	Малотоксично
Пектиновые вещества древесной зелени	815	Малотоксично

Результаты исследования острой токсичности позволяют отнести полисахаридные фракции древесной зелени и шишек ели обыкновенной к классу 4 малотоксичных веществ. ВРПК шишек и древесной зелени обладает гораздо меньшей токсичностью (LD₅₀ >5000) по сравнению с пектиновыми веществами, полученными из тех же органов. Самой токсичной оказалась фракция пектиновых веществ древесной зелени (815 мг/кг).

Таблица 3

Противовоспалительная активность полисахаридных фракций ели обыкновенной

Фракция	% прироста стопы через 4 ч	% торможения через 4 ч
ВРПК шишек	37,6±12,9 p<0,001	65
ВРПК древесной зелени	49,7±9,9 p<0,001	54,6
Пектиновые вещества шишек	55,3±4,9 p<0,001	49,5
Пектиновые вещества древесной зелени	52,3±11,5 p<0,001	52,2
Контроль	109,5±4,7	

p – достоверность в сравнении с контролем

Данные таблицы 2 демонстрируют достаточно высокий уровень противовоспалительной активности фракций комплекса полисахаридов древесной зелени и шишек ели обыкновенной.

Самой активной фракцией оказалась фракция ВРПК шишек, процент торможения 65%. ВРПК древесной зелени тормозит образование отека в сравнении с контролем на 54,6%. Пектиновые вещества древесной зелени и шишек оказались менее активными.

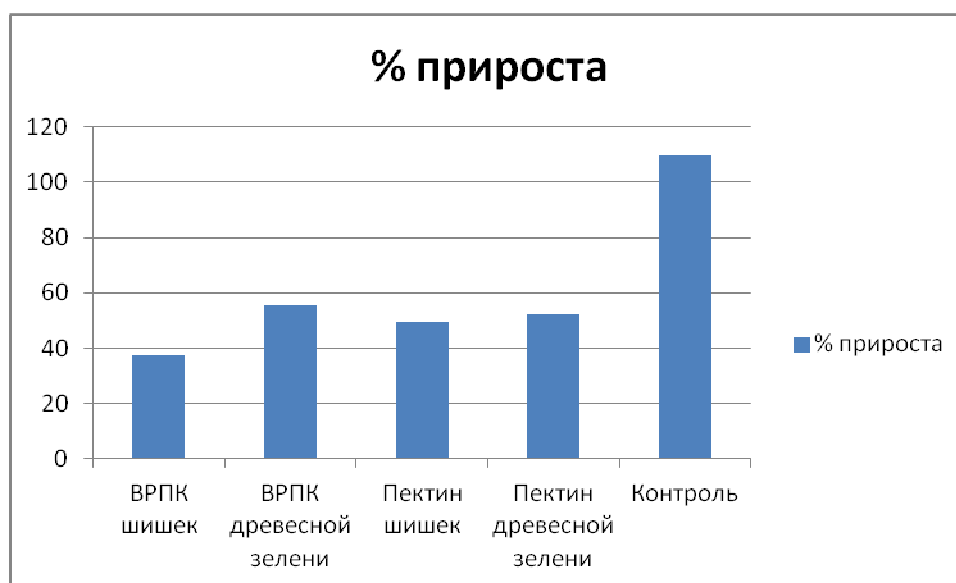


Рис. 1. Процент прироста стопы

На диаграмме видно, что на фоне введения полисахаридных фракций прирост стопы, вызванный субплантарным введением в заднюю лапу крысы 0,1 мл 1%-ного водного раствора каррагинина, через 4 ч значительно уменьшается по сравнению с контролем. Торможение отека составляет 49,5–65% в зависимости от фракции.

Учитывая, что ВРПК шишек и древесной зелени отнесен к классу малотоксичных веществ, возможно применение данной фракции в качестве противовоспалительного средства при практически отсутствующем вреде для организма.

Заключение

1. В результате изучения содержания полисахаридных фракций установлено, что в древесной зелени ели обыкновенной содержится больше пектиновых веществ, а в шишках выше содержание водорастворимого полисахаридного комплекса.
2. Установлено что водорастворимый полисахаридный комплекс древесной зелени и шишек ели обыкновенной является менее токсичным $LD_{50} > 5000$ мг/кг, чем пектиновые вещества.
3. Установлено, что самой активной фракцией, проявляющей противовоспалительный эффект, является ВРПК шишек (торможение отека 65%). Остальные фракции показали активность с процентом торможения около 50%.

Список литературы

1. Гуляев Д.К., Белоногова В.Д., Коротков И.В. Оптимизация стандартизации ели обыкновенной шишек // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 6.
2. Гуляев Д.К., Белоногова В.Д., Коротков И.В. Фармакогностическое изучение древесной зелени и шишек ели обыкновенной // Вестник ПГФА. 2013. С. 44–47.
3. Гуляев Д.К., Белоногова В.Д., Коротков И.В. Фитохимическое исследование древесной зелени ели обыкновенной // Сборник научно-практической конференции с международным участием, посвященный тридцатилетию ЯГМА, Состояние и перспективы оптимизации и эффективности в фармакогнозии, технологии, клинике». Ярославль. 2014. С. 74–76.
4. Ефимова Л.А., Крылова С.Г., Зуева Е.П., Хотимченко Ю.С., Хотимченко Ю.М. Экспериментальное исследование противовоспалительного и анальгезирующего действия некрахмального полисахарида пектата кальция // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2010. Т. 73, № 4. С. 23–26.
5. Криштанова Н.А., Сафонова М.Ю., Болотова В.Ц., Павлова Е.Д., Саканян Е.И. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств // Вестник ВГУ. №1. 2005. С. 212–221.
6. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М.: Гриф и К. 2012. – 944 с.
7. Несмеянова В.А., Хорлина А.Я. Методы исследования углеводов. М. Мир, 1975. С. 445.
8. Оводов Ю.С. Полисахариды цветковых растений: структура и физиологическая активность // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24. № 7. С. 483–501.

9. Хотимченко Ю.С., Ермак И.М., Бедняк А.Е. и др. Фармакология некрахмальных полисахаридов // Вестник ДВО РАН. 2005. № 1. С. 72–82.
10. Хотимченко М.Ю., Коленченко Е.А. Эффективность низкоэтерифицированного пектина при токсическом поражении печени, вызванном введением свинца // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. Т. 144, № 7. С. 65–67.
11. Huang R., Du Y., Yang J., Fan L. Influence of functional group on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate // Carbohydr. Res. 2003. Vol. 338. P. 483-489.

Рецензенты:

Солонина А.В., д.фарм.н., профессор, заведующая кафедрой УЭФ, ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пермь;

Хомов Ю.А., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии ФДПО и ФЗО, ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пермь.