

УДК 615; 615.322

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВИНОГРАДА ЛИСТЬЕВ КРАСНЫХ ЭКСТРАКТА СУХОГО (*VITIS VINIFERA* L.)

Е.В. Ферубко^{1*}, Т.Е. Лескова¹, В.К. Колхир¹, В.Н. Дул¹, Н.И. Сидельников¹

Резюме. В статье представлены результаты изучения фармакологической активности винограда листьев красных экстракта сухого. Установлено, что экстракт обладает антиагрегационными, противовоспалительными, противоотечными, анальгезирующими, капилляропротективными свойствами. Винограда листьев красных экстракт сухой может быть рекомендован для проведения клинических исследований при заболеваниях, связанных с сосудистыми нарушениями, в том числе при хронической венозной недостаточности.

Ключевые слова: винограда листьев красных экстракт, фармакологическая активность.

STUDY OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF THE DRY EXTRACT OF RED GRAPE LEAVES (*VITIS VINIFERA* L.)

E.V. Ferubko^{1*}, T.E. Leskova¹, V.K. Kolkhir¹, V.N. Dul¹, N.I. Sidelnikov¹

Abstract. The article are presented the results of studying of the pharmacological activity of the dry extract of red grape leaves (*Vitis vinifera* L.). The extract has showed anti-aggregation, anti-inflammatory, decongestant, analgesic, capillaroprotective properties. The dry extract of red grape leaves can be recommended for clinical trials in diseases associated with vascular disorders, including chronic venous insufficiency.

Keywords: extract of red grape leaves, pharmacological activity.

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, 7

1 – All-Russian Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 7, Green's str., Moscow, 117216, Russian

* адресат для переписки:

E-mail: ekaterina-ferubko@rambler.ru

Тел.: 8 (495) 388 11 00

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные растения – перспективный источник препаратов для профилактики и лечения заболеваний, связанных с сосудистыми нарушениями, в том числе хронической венозной недостаточности (ХВН). ХВН протекает тяжело, с заметным снижением качества жизни [1, 2]. Поэтому поиск и разработка новых эффективных и безопасных препаратов из лекарственного растительного сырья для лечения ХВН является актуальной задачей современной фармакологии.

Для лечения ХВН применяются, как правило, зарубежные фитопрепараты на основе тритерпеновых и стероидных сапонинов, флавоноидов и других биологически активных веществ – «Детралекс», «Флебодиа 600», «Рутозид», «Венорутон», «Троксерутин», «Троксевазин», «Эсцин», «Венитан» и другие [3–7]. В настоящее время популярность приобретают лекарственные средства на основе экстракта из листьев винограда. Одним из таких препаратов является импортное ангиопротекторное средство «Антистакс» [8, 9].

В связи с этим интерес для изучения специфической активности представляют листья винограда культурного (*Vitis vinifera* L.), выращиваемого в условиях нашей страны [10]. В Центре химии и фармацевтической технологии ФГБНУ «ВИЛАР» разработан способ получения сухого экстракта из красных листьев винограда, содержащего сумму фенольных соединений – 7,94% в пересчете на рутин [11, 23, 24].

Предварительные исследования, проведенные в ФГБНУ «ВИЛАР», по изучению биологической активности винограда листьев красных экстракта сухого (ВЛКЭС) в условиях опытов *in vitro* с применением специфических ферментных биотест-систем показали, что экстракт обладает антиоксидантными и вентонизирующими свойствами [12]; в условиях *in vivo* установлено гастропротективное действие экстракта на слизистую оболочку желудка крыс [13].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В отделе экспериментальной и клинической фармакологии ФГБНУ ВИЛАР проведено изучение фармакологической активности ВЛКЭС в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг в сравне-

нии с известным растительным лекарственным препаратом Антистакс® («Берингерм Ингельхайм», Швейцария).

Опыты выполнялись на нелинейных мышах обоего пола массой 18–22 г; нелинейных белых крысах обоего пола массой 180–220 г; кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,8–3,5 кг. Производитель мышей и крыс – Филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область); производитель кроликов – ООО «КролИнфо» (Московская область). Лабораторных животных содержали в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Исследование проводили в соответствии с рекомендациями [17]. Экстракт растворяли в 1% крахмальном клейстере и вводили внутривенно в дозах 10 и 100 мг/кг. Животные контрольной группы получали внутрь эквивалентный объем 1% крахмального клейстера. Препарат сравнения Антистакс® вводили животным в дозе 100 мг/кг по аналогичной схеме.

Изучение влияния ВЛКЭС на функциональную активность тромбоцитов *in vitro* было проведено в условиях АДФ – индуцированной агрегации тромбоцитов. Гемоагрегационные свойства экстракта изучались с использованием венозной крови кроликов-самцов породы шиншилла массой 2,8–3,5 кг. Забор крови производили из краевой вены уха методом свободного падения в условиях стабилизации 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Агрегацию тромбоцитов исследовали с помощью компьютеризированного двухканального лазерного анализатора агрегации тромбоцитов 230 LA «Biola» (НФП «Биола», Россия) [14, 15]. В качестве индуктора агрегации использовали АДФ (НПО «РЕНАМ», Россия) в конечной концентрации 1×10^{-5} М. О степени агрегации судили по максимальной величине падения оптической плотности после окончания реакции (A_{max}) по сравнению с исходной величиной.

Изучение нейропротекторной активности ВЛКЭС проводили в опытах *in vivo* с использованием общепринятых тестов, позволяющих оценить стресспро-

тективные, противотревожные, седативные, общеукрепляющие свойства экстракта [17]. Тестирование начинали через 30–45 мин после однократного введения изучаемого экстракта и препарата сравнения. Изучение влияния экстракта на течение острой экссудативной фазы воспаления проводили по методу Тринуса [18]. Через 3 ч на пике воспаления регистрировали прирост объема экссудата. Влияние ВЛКЭС на течение экспериментального перитонита было изучено по методу Либермана [19]. Модель воспроизводили путем внутрибрюшинного введения 0,2% раствора азотнокислого серебра в количестве 1,0 мл/100 г. Через 4–5 ч животных под наркозом CO_2 забивали и измеряли количество образовавшейся серозной жидкости в брюшной полости. Изучение влияния экстракта на проницаемость сосудов кожи животных проводили по методу Ойвина и Монаковой [20]. Критерием сосудистой проницаемости капилляров служила интенсивность окрашивания в очаге воспаления по сравнению с контролем (в баллах). Изучение противоотечного действия ВЛКЭС проводилось на модели интерстициального отека [21]. Объем отека лап животных оценивали онкометрическим методом и рассчитывали скорость рассасывания отека в динамике через 30, 90, 120 мин. Влияние экстракта на течение хронической пролиферативной фазы воспаления проводили по методу Meier. На 8-е сутки производили извлечение гранулем и регистрировали количественные изменения во влажном состоянии (антиэкссудативная активность), затем – в высушенном (пролиферативная активность). Для изучения влияния ВЛКЭС на порог болевой чувствительности мышей использовали модель патологической боли. Специфическую химическую болевую реакцию «корчи» воспроизводили по методу С. Cashin [22]. Регистрацию количества специфических ноцицептивных ответов проводили через 45–60 мин воздействия экстракта.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли при помощи пакета программ Statistica 6.0 (Stat Soft, США).

Таблица 1.

Влияние ВЛКЭС на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*

Вещество	Степень агрегации A_{max} (M±m), %					
	Концентрация добавленного вещества в пробе, мг/мл					
	0,00 Контроль	0,01	0,10	0,50	1,00	10,00
ВЛКЭС	34,2±3,5	32,3±0,9*	30,4±2,7	28,0±1,4**	21,6±1,9*	22,4±1,0*
Антистакс®	34,2±1,0*	33,9±1,3*	32,4±2,0	30,2±2,2	32,8±1,8	30,0±2,3
Аспирин	35,1±1,8*	17,4±1,3*	12,6±2,6	10,7±1,5*	9,2±0,8*	10,2±1,3*

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля при $p \leq 0,05$ [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов установлено, что ВЛКЭС обладает антиагрегационной активностью в условиях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro*, снижает степень агрегации тромбоцитов на 6–37% в интервале концентраций 0,01–10,0 мг/мл. Наиболее заметный эффект (37% от поглощения в контроле) наблюдается при концентрации экстракта 1,0 мг/мл пробы (таблица 1). Активность препарата сравнения – аспирин – превосходит действие изучаемого экстракта, аспирин уменьшает степень агрегации тромбоцитов на 51–74%. Антистакс® не оказывает влияния на агрегацию тромбоцитов.

Изучение нейропротекторной активности ВЛКЭС с использованием общепринятых тестов, позволяющих оценить стресспротективные, противотревожные, седативные, общеукрепляющие свойства, показало, что экстракт в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг и препарат сравнения «Антистакс» в дозе 100 мг/кг не оказывают отрицательного влияния на ЦНС и поведение животных.

Исследования по изучению влияния экстракта на течение острого экссудативного воспаления представлены в таблице 2. Экстракт при четырехдневном введении ингибировал развитие формалинового отека лап мышей по сравнению с контролем на 20,18%, несколько уступая по активности Антистаксу®. На модели экспериментального перитонита ВЛКЭС проявил выраженный дозозависимый антиэкссудативный эффект. Экстракт в дозе 100 мг/кг достоверно подавлял степень образования экссудата в брюшной полости на 33,04%, Антистакс® – на 12,68%, по сравнению с контрольной группой животных. Одним из механизмов развития отека является увеличение проницаемости сосудов в очаге воспаления. Оценка капилляроукрепляющей активности ВЛКЭС в очаге локального ксилолового воспаления показала, что даже при однократном введении экстракт способен укреплять стенки кожных сосудов, тормозить выход трепановой сини в 1,2 раза по сравнению с контролем. При этом его активность выше активности Антистакса®.

Данные экспериментов по изучению противоотечной активности, представленные в таблице 3, свидетельствуют, что активность экстракта винограда превосходит активность препарата сравнения Антистакс® по ускорению резорбции отека. Наибольший противоотечный эффект экстракт проявляет в дозе 100 мг/кг через 90 мин наблюдения и составляет 45,26% по сравнению с контрольной группой. Активность препарата Антистакс® в данный промежуток времени уступала активности экстракта и составляла 25,25%.

В условиях модели хронического пролиферативного воспаления экстракт винограда и Антистакс® не оказывают существенного антипролиферативного действия (таблица 4). Однако в дозе 100 мг/кг ВЛКЭС

проявляет антиэкссудативную активность, уменьшая массу влажных гранулем на 18,93% по сравнению с контролем. Этот эффект превосходит активность препарата сравнения.

Таблица 2.

Влияние ВЛКЭС на течение экссудативной фазы воспаления

Препарат	Доза, мг/кг	Прирост объема экссудата на пике воспаления, мг, эффект в %	Перитониальный экссудат, мл, эффект в %	Проявления окраски в очаге воспаления, в баллах (отношение к контролю)
Контроль	–	36,33±3,16	2,29±0,31	2,83±0,4
ВЛКЭС	10	32,83±3,62 9,55%	1,98±0,26 3,53%	2,66±0,36 (1,06)
	100	29,0±2,44* 20,18%	1,52±0,25* 33,04%	2,33±0,4* (1,2)
Антистакс®	100	27,5±3,07* 24,30%	1,73±0,17 12,68%	2,50±0,43 (1,13)

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля при $p \leq 0,05$ [22].

Таблица 3.

Изучение противоотечного действия ВЛКЭС

Время наблюдения, мин	Снижение объема конечности по отношению к контролю, в %		
	ВЛКЭС		Антистакс® 100 мг/кг
	10 мг/кг	100 мг/кг	
30	18,07	28,78	13,23
90	36,84*	45,26*	25,25*
120	34,40*	37,09*	17,50

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля при $p \leq 0,05$ [22].

Таблица 4.

Изучение влияния ВЛКЭС на хроническое пролиферативное воспаление

Препарат	Доза, мг/кг	Масса влажных и сухих гранулем, в мг	
		Влажных гранулем	Сухих гранулем
Контроль	–	46,11±0,18	11,05±0,27
ВЛКЭС	10	42,23±0,1,6	11,23±0,49
ВЛКЭС	100	37,38±0,17* 18,93%	11,60±0,36
Антистакс®	100	39,77±1,09	10,72±0,33

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля при $p \leq 0,05$ [22].

Результаты изучения анальгетической активности экстракта представлены в таблице 5. При однократном внутривенном введении ВЛКЭС достоверно уменьшает количество специфических ноцицептивных ответов – «корчей» на химический раздражитель, проявляет дозозависимый анальгетический эффект по сравнению с аналогичными показателями животных контрольной группы. Коэффициент анальгезии экстракта в дозе 100 мг/кг превосходит активность Антистакса® и составляет 67,21%.

Таблица 5.

Изучение анальгетической активности ВЛКЭС

Препарат	Доза, мг/кг	Количество «корчей», усл. ед.	Коэффициент анальгезии, %
Контроль	–	27,71±1,96	–
ВЛКЭС	10	16,5±2,04*	40,56
	100	9,16±1,60*	67,21
Антистакс®	100	14,00±2,01*	49,57

Примечание: * – значения достоверно отличаются от контроля при p≤0,05 [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований установлено, что винограда листьев красных экстракт сухой проявляет антиагрегационную активность в условиях опытов *in vitro*. В опытах на животных ВЛКЭС в дозе 100 мг/кг оказывает достоверно выраженное противовоспалительное антиэкссудативное, капилляроукрепляющее, анальгетическое действие.

Таким образом, ВЛКЭС обладает широким спектром фармакологической активности и является перспективным для разработки отечественных лекарственных препаратов для профилактики и лечения заболеваний, сопровождающихся сосудистыми нарушениями.

ЛИТЕРАТУРА

- В.С. Савельев, А.В. Покровский, И.И. Затевахин, А.И. Кириенко. Российские клинические рекомендации по диагностики и лечению хронических заболеваний вен // Флебология. 2013. № 2. Т. 2. С. 40–48.
- Г.Ж. Нерсян. Консервативное лечение больных с хронической венозной недостаточностью при варикозной болезни нижних конечностей в амбулаторных условиях: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Тюмень. 2009. 23 с.
- А.О. Шекоян, В.Ю. Богачев. Венозная боль: патофизиология и принципы лечения // Флебологическая. 2010. № 36. С. 2–6.
- Ю.М. Стойко, Н.А. Ермаков. Флеботоники в терапии хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Лечащий врач. 2005. № 8. С. 84–86.
- А.В. Покровский, С.В. Сапелкин. Производные полусинтетического диосмина в лечении больных с хронической ве-

- нозной недостаточностью – результаты проспективного исследования с применением препарата «Флебодиа 600» // Ангиология и сосудистая хирургия. 2005. № 4. С. 73–79.
- Энциклопедия лекарств и товаров аптечного ассортимента. URL: <http://www.rlsnet.ru/> (дата обращения 15.08.2016).
- Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Выпуск XV. – М. 2014. С. 562.
- И.И. Кательницкий, А.В. Куринной. Применение препарата Антистакс® в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. 2007. № 1. С. 43–46.
- H. Kiesewetter, J. Kosclelny, U. Kalusetall. *Arznein Forsch // Drug Res.* 2000. № 50(1). P. 109–117.
- Ю.М. Стойко, В.Г. Гудымович. Патогенетические аспекты применения препарата Антистакс® в комплексном лечении больных с хронической венозной недостаточностью нижних конечностей // Фарматека. 2005. С. 61–65.
- В.Н. Дул. Фармакогностическое изучение и стандартизация винограда культурного (*Vitis Vinifera* L.) листьев красных и сухого экстракта на их основе: дис. ... к.фарм.н. – М. 2014. 118 с.
- Е.В. Ферубко, И.А. Лупанова, В.К. Колхир, Т.А. Сокольская. Исследование биологической активности винограда культурного листьев красных экстрактов сухих с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях *in vitro* // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2014. № 10. С. 23–26.
- Ю.А. Трифонов, В.К. Колхир, Т.А. Сокольская, Е.В. Ферубко, Т.Р. Курманов. Фармакологическое исследование противоязвенного действия винограда листьев красных экстракта сухого (*Vitis vinifera* L.) // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2011. № 11. С. 64–69.
- K.M. Moser. Venous thromboembolism // *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990. V. 141. P. 235–249.
- G.V.R. Born. Quantitative investigation into the aggregation of blood platelets // *J. Physiol.* 1962. P. 67–68.
- М.Л. Беленький. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Рига. 1959.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I. – М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- Ф.Н. Тринус. Методы скрининга и фармакологического изучения противовоспалительных, анальгезирующих и жаропонижающих веществ. – Киев. 1974.
- С.С. Либерман, С.Н. Кутчан, Э.А. Рудзит, Н.Г. Шахназаров. Противовоспалительная активность эстоцина // Фармакология и токсикология. 1972. № 3. С. 333–335.
- И.А. Ойвин, К.Н. Монакова. Методика количественного изучения эффективности противовоспалительных средств // Фармакология и токсикология. 1953. Т. 16. № 3. С. 50–51.
- Патент РФ № 2290189. Средство, обладающее венотонизирующим, противовоспалительным и капилляроукрепляющим действием, и способ его получения / И.Ю. Макаров. – Заявл. 17.06.2005; опубл. 27.12.2006.
- C.H. Cashin, W. Dawson, E.A. Kitchen. To benoxaprofen (2, 4 – chlorophenyl – methyl –5- benzoxazoli acetic acid) LRC 13694, a new compound with anti inflammatory activity apparently unrelated to inhibition of prostaglandin synthetase // *J. Pharmacol.* 1977. V. 29. P. 330–336.
- Патент РФ № 2568908. Способ получения средства, обладающего антиоксидантной активностью / В.Н. Дул, Т.Д. Даргаева, А.А. Кирьянов, О.Л. Сайбель и др.; патентообладатель ГНУ ВИЛАР. – 22.08.2014.
- В.Н. Дул, Т.Д. Даргаева, О.Л. Сайбель. Разработка методик контроля качества сухого экстракта красных листьев винограда культурного // Молодые ученые и фармацевтика XXI века. Сборник научных трудов второй научно-практической конференции. 2014. С. 72–75.