

Противовоспалительный потенциал *Cryptolepis buchanani* in vitro и in vivo

Pisamai Laupattarakasem ^{a,*}, Tasanee Wangsrimongkol ^a,
Руди Сурарит ^б, Чария Ханваджанавонг ^в

^aКафедра фармакологии медицинского факультета Университета Кхон Каен, Кхон Каен 40002, Таиланд

^бКафедра физиологии, стоматологический факультет, Университет Махидол, Бангкок 10400, Таиланд

^вКафедра микробиологии, медицинский факультет, Университет Кхон Каен, Кхон Каен 40002, Таиланд

Получено 2 декабря 2005 г.; получено в пересмотренном виде 3 марта 2006 г.; принято 18 мая 2006 г.

Доступно онлайн 6 июня 2006 г.

Аннотация

Cryptolepis buchanani Roem. & Schult. (Asclepiadaceae), вьющееся дерево, используется в народной медицине в Юго-Восточной Азии. В Таиланде стебель этого растения традиционно используется для лечения воспалений, в том числе артрита, а также мышечных и суставных болей. В данном исследовании потенциальная противовоспалительная активность 50-процентного этанольного экстракта этого растения оценивалась в ряде экспериментальных моделей. В случае противовоспалительной активности экстракт вызывал уменьшение отека лапы крысы, вызванного каррагинаном, а также значительное снижение выработки эйкозаноидов кальциевым ионофором A23187, стимулированным перитонеальными лейкоцитами крысы. В тесте на противовоспалительный потенциал с использованием гранулемы, вызванной хлопковой нитью, экстракт вызвал значительное снижение образования грануляционной ткани. Снижение высвобождения фактора некроза ОПУХОЛИ-А (TNF-А) из LPS-стимулированной линии моноцитарных клеток человека (THP-1) также было продемонстрировано в клетках, предварительно инкубированных с экстрактом. Еще одной важной особенностью *Cryptolepis buchanani* является его низкая токсичность, особенно при пероральном приеме, что значительно стимулирует клинические испытания этого экстракта на человеке. В заключение следует отметить, что полученные результаты дают научную поддержку традиционному использованию этого растения для борьбы с воспалением. Необходимы дальнейшие исследования для выявления активных компонентов, ответственных за противовоспалительную активность *Cryptolepis buchanani*. Перед клиническими испытаниями также необходимо провести подострые и хронические токсикологические исследования на животных.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. Все права защищены.

Ключевые слова: *Cryptolepis buchanani*; Asclepiadaceae; противовоспалительное действие; острая токсичность; народная медицина

1. Введение

Cryptolepis buchanani Roem. & Schult. (Asclepiadaceae), вьющееся дерево, широко используется в народной медицине Юго-Восточной Азии. В Таиланде спиртовой экстракт стебля этого растения широко используется для лечения воспалительных заболеваний, таких как артрит, боли в мышцах и суставах (Panthong et al., 1986; Laupattarakasem et al., 2003). Слабое ингибирование

Ранее сообщалось о снижении выработки эйкозаноидов лейкоцитами крыс, но оно не было дозозависимым (Laupattarakasem et al., 2003). Поэтому мы провели эксперименты по повторной оценке противовоспалительного потенциала этого растения при остром и хроническом воспалении с использованием нескольких экспериментальных моделей *in vitro* и *in vivo*. В предварительное исследование токсичности был включен тест на острую токсичность.

Воспаление - это процесс, включающий множество факторов, действующих в сложной сети. Попадание лейкоцитов в очаг воспаления имеет решающее значение для патогенеза воспалительных заболеваний (Colditz, 1985; Kasama et al., 1995). Известно, что нейтрофилы и макрофаги рекрутируются и играют ключевую роль в остром и хроническом воспалении, соответственно (Kasama et al., 1993). В месте воспаления рекрутированные клетки активируются и выделяют множество медиаторов воспаления, которые вызывают инициацию и поддержание воспалительного ответа, что приводит к переходу острой фазы воспаления в хроническую. Поэтому ингибирование клеточных реакций является одной из целей, которые обычно используются в качестве модели *in vitro* для

Сокращения: 5-LO, 5-липооксигеназа; AA 861, 2-(12-гидроксидодека-5,10-диенил)-3,5,6-триметил-п-бензохинон; ASA, ацетилсалициловая кислота; COX, циклооксигеназа; DMSO, диметилсульфоксид; EIA, иммуноферментный анализ; FBS, фетальная бычья сыворотка; HBSS, сбалансированный солевой раствор Хэнка; IDM, индометацин; LD₅₀, летальная доза₅₀; LPS, липополисахарид; LTВ₄, лейкотриен В₄; PMA, фторбол-12-миристан-13-ацетат; PMNs, полиморфноядерные; THP-1, моноцитарная клеточная линия лейкемии человека; TNF-А, ФАКТОР некроза опухоли-α; ТХВ₂, тром-боксан В₂.

* Корреспондирующий автор. Тел: +66 1 601 2001; факс: +66 43 348 397.

Адрес электронной почты: pislau@kku.ac.th (P. Laupattarakasem).

противовоспалительные испытания. Для испытаний *in vivo* воспаление может быть вызвано у животных многими веществами. Отек лапы крысы - наиболее часто используемая модель острого воспаления, в то время как подкожная имплантация биоматериала обычно используется для модели хронического воспаления. В данном исследовании оценка противовоспалительного потенциала 50% этанольного экстракта *Cryptolepis buchanani* проводилась с использованием тестов *in vitro* и *in vivo*. Ингибирование выработки эйкозаноидов нейтрофилами крыс и высвобождение провоспалительных цитокинов (например, фактора некроза ОПУХОЛИ-А, TNF-А) из макрофагов использовались в качестве маркеров для тестов *in vitro* на острое и хроническое воспаление соответственно. В качестве модели острого и хронического воспаления использовали отек лапы крысы, вызванный каррагинаном, и грануляцию, вызванную хлопковой нитью.

2. Материалы и методы

2.1. Химикаты

Ионофор кальция (A23187), гликоген устрицы (тип II), индометацин (IDM), 2-(12-гидроксидодека-5,10-диенил)-3,5,6-триметил-п-бензохинон (AA 861), ацетилсалициловая кислота (ASA), этилацетат, диметилсульфоксид (DMSO), каррагинан, фторбол-12-миристинат-13-ацетат (PMA), липополисахарид (LPS) из *E.coli* 026:В₆ были получены от Sigma-Aldrich (Сент-Луис, МО, США). Среда RPMI-1640, фетальная бычья сыворотка (FBS), пенициллин и стрептомицин, эндотелиальная среда человека SFM, среда 199, раствор трипсина и ЭДТА были получены от Gibco-BRL (Карлсруэ, Германия). Наборы для иммуноферментного анализа тромбосана В₂(ТХВ₂) и лейкотриена В₄(LTВ₄) были приобретены у Amersham Biosciences (Нью-Джерси, США). Набор для иммуноферментного анализа TNF-А был получен от BD Biosciences (Нью-Джерси, США).

2.2. Растительный материал и экстракт препарата

Cryptolepis buchanani был идентифицирован доктором

Арунпорном Итхаратом.

и собран в провинции Сонгкла на юге Таиланда. Ваучерные образцы этого растения (SKP A 0180101) были переданы на хранение на кафедру фармацевтической ботаники и фармакогнозии факультета фармацевтических наук Университета принца Сонгкла, Хат Яй, Таиланд. После высушивания растительного материала его дважды обрабатывали 50% этанолом. Затем экстракт отфильтровывали и центрифугировали при 800× g в течение 10 мин. Этанол удаляли под пониженным давлением методом ротационного испарения, а водный остаток удаляли лиофилизацией. Процентный выход рассчитывался на основе веса высушенного растительного материала. Для тестирования экстракт растворяли в транспортном средстве и разбавляли до нужных концентраций.

2.3. Животные

Крысы Sprague-Dawley (200± 50 г) и швейцарские мышьяльбиносы (25± 5 г) были получены с медицинского факультета Университета Кхон Каен. Они содержались в стандартных экологических условиях и получали стандартную диету для грызунов с водой *ad libitum*. Все процедуры, связанные с использованием животных

Исследования проводились в соответствии с рекомендациями Комитета по этике при Университете Кхон Каен.

2.4. Генерация эйкозаноидов ионофорно-стимулированными перитонеальными лейкоцитами крысы

Перитонеальные лейкоциты крыс готовили по стандартному методу (Moroney et al., 1988). Вкратце, накопление лейкоцитов стимулировали внутрибрюшинным введением 6% гликогена устриц в физиологическом растворе. Через 16-20 ч крыс приносили в жертву, а перитонеальные лейкоциты немедленно промывали ледяным модифицированным сбалансированным солевым раствором Хэнка (HBSS), не содержащим Са²⁺ и Mg²⁺. После центрифугирования при 400× g в течение 10 мин при 4° С загрязняющие эритроциты в гранулах лизировали трис-буфером NH₄Cl. После дальнейшего центрифугирования клеточную гранулу повторно суспендировали в полной HBSS в концентрации 2,5× 10⁶ клеток/мл, содержащей Са²⁺ и Mg²⁺. Жизнеспособность клеток, судя по трипанового синего, составляла более 95%. По этому методу смешанные перитонеальные лейкоциты состояли примерно на 75% из полиморфноядерных нейтрофилов (ПМЯЛ).

Триплицированные аликвоты ПМН объемом 0,5 мл предварительно инкубировали в течение 10 мин при 37° С с экстрактом, транспортным средством или эталонными препаратами: индометацином (5 МКМ) для ингибирования циклооксигеназы или AA 861 (1 МКМ) для ингибирования 5-липооксигеназы, а затем стимулировали еще в течение 10 мин добавлением ионофора кальция А23187 (1 МКМ). Клетки гранулировали центрифугированием при 400× g в течение 10 мин при 4° С, супернатанты отбирали и замораживали при -20° С. Аликвоты (2-25 МКЛ) размороженных образцов подвергали иммуноферментному анализу (ИФА) на тромбосан В₂(ТХВ₂) и лейкотриен В₄(LTВ₄) (Amersham, США). Анализ основан на конкуренции между ТХВ₂ и LTВ₄ за ограниченное количество мест связывания на ТХВ₂/LTВ₄-специфическом антителе. При фиксированном количестве антитела и меченого пероксидазой ТХВ₂/LTВ₄ количество меченого пероксидазой лиганда, связанного антителом, было обратно пропорционально концентрации добавленного немеченого лиганда. Концентрация немеченого ТХВ₂/LTВ₄ в образце может быть определена путем интерполяции по стандартной кривой.

2.5. Выработка TNF-а из ЛПС-стимулированных ТНР-1

Монокитарные лейкозные клетки человека ТНР-1 культивировали в пластиковых колбах диаметром 75 см² бычьей сывороткой, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 МКГ/МЛ стрептомицина (GIBCO-BRL, Германия). Культуру клеток поддерживали при температуре 37° С в увлажненной 5% СО₂ атмосфере. Согласно методу, описанному Singh et al. (2005), клетки в экспоненциальной фазе роста трипсинизировали и готовили клеточную суспензию в полной среде при концентрации 5× 10⁵ клеток/мл. Около 500 МКЛ клеточной суспензии предварительно активировали PMA (100 нМ) в 24-луночном планшете в течение 48 ч для трансформации в макрофаги перед преинкубацией со 100 мкл различных концентраций (1, 5, 50, 100, 200 МКГ/МЛ) экстракта *Cryptolepis buchanani*. Клетки с дексаметазоном (1 МКМ) и транспортным средством (0,5% ДМСО) использовались в качестве эталонного препарата и контроля, соответственно. После 30-минутной предварительной обработки тестовыми соединениями клетки инкубировали с 1 мкг/мл ЛПС (Sigma, США) в течение 24 ч. Свободные от клеток супернатанты собирали

Уровень TNF- α определяли методом EIA (BD Biosciences, США).

2.6. Отек задней лапы, вызванный каррагинаном

Противовоспалительную активность *Cryptolepis buchanani* исследовали на модели отека лапы крыс, вызванного каррагинаном, как описано Winter et al. (1962). Использовали крыс весом 200 ± 50 г. Животных предварительно обрабатывали экстрактом в дозах 100, 250 и 500 мг/кг при внутривенной инъекции или 1000 мг/кг перорально каждой группе из шести крыс в течение 60 минут перед субплантарным введением 0,1 мл 1% раствора каррагинана. В качестве положительного контроля использовали аспирин (300 мг/кг, перорально). Объем отека определяли через 1, 2 и 3 ч после введения каррагинана методом вытеснения воды (плетизмометр, модель 7150, Ugo Basile). Объемы отеков сравнивали между группами лечения и контроля.

2.7. Грануляционная ткань, вызванная хлопковой нитью, у крыс

Грануляцию тканей вызывали имплантацией хлопковой нити самцам крыс Sprague-Dawley в соответствии с опубликованной методикой (Ghosh et al., 2002) с небольшими изменениями. Хлопчатобумажную нить промывали этилацетатом в течение ночи, сушили при комнатной температуре, разрезали на отрезки длиной 2 см ($7 \pm 0,5$ мг) и стерилизовали сухим жаром при 160°C в течение 2 ч. Этанольный экстракт *Cryptolepis buchanani* в концентрации 150 и 300 мг/кг вводили внутривенно или 1000 мг/кг перорально каждой группе из шести крыс за 60 мин до подкожной имплантации хлопчатобумажной нити на спину каждой крысы под анестезией. Около 1 мг/кг дексаметазона вводили перорально в качестве контрольного препарата, в то время как контрольные крысы получали такой же объем транспортного средства. Далее каждую группу крыс обрабатывали экстрактом или контрольным веществом один раз в день в течение шести дней подряд. На 8-й день крысы были принесены в жертву, нити, покрытые грануляционной тканью, были иссечены и высушены в горячей воздушной печи при температуре 60°C до получения постоянного веса. Вес грануляций сравнивали между лечебной и контрольной группами.

2.8. Тест на острую токсичность

Острую токсичность *Cryptolepis buchanani* оценивали с помощью теста на летальную дозу, включающего однократное введение экстракта растения группе мышей-самцов и самок в возрастающих дозах с целью определения дозы, которая приведет к гибели 50% мышей (LD_{50}) в течение установленного периода времени. Мыши (весом 20-25 г) были разделены на пять групп ($n=6$). Экстракт перорально в дозе 1000 мг/кг или внутривенно в дозах 200, 400, 800 и 1000 мг/кг. Наблюдения за токсическими симптомами и смертностью регистрировали через 1, 2, 3 и 24 ч, затем один раз в день в течение 7 дней и оценивали LD_{50} экстракта.

3. Статистический анализ

Статистическая значимость результатов анализировалась с помощью t-теста Стьюдента для непарных наблюдений. Результаты были

выражены как среднее \pm стандартная ошибка среднего (S.E.M.), значения статистической значимости установлены при $*P \leq 0,05$ и $**P \leq 0,001$.

4. Результаты

4.1. Влияние растительного экстракта на выработку эйкозаноидов

Добавление 1 мкМ ионофора кальция A23187 к суспензии смешанных лейкоцитов крыс (нейтрофилы PMN и мононуклеарные клетки) вызвало генерацию эйкозаноидов через циклооксигеназный (COX) и 5-липооксигеназный (5-LO) пути, что привело к высвобождению TXB_2 и LTB_4 , соответственно (рис. 1). В качестве эталонных использовали два ингибитора, известных как мощные и специфические ингибиторы. Предварительно клетки обрабатывали индометацином (COX

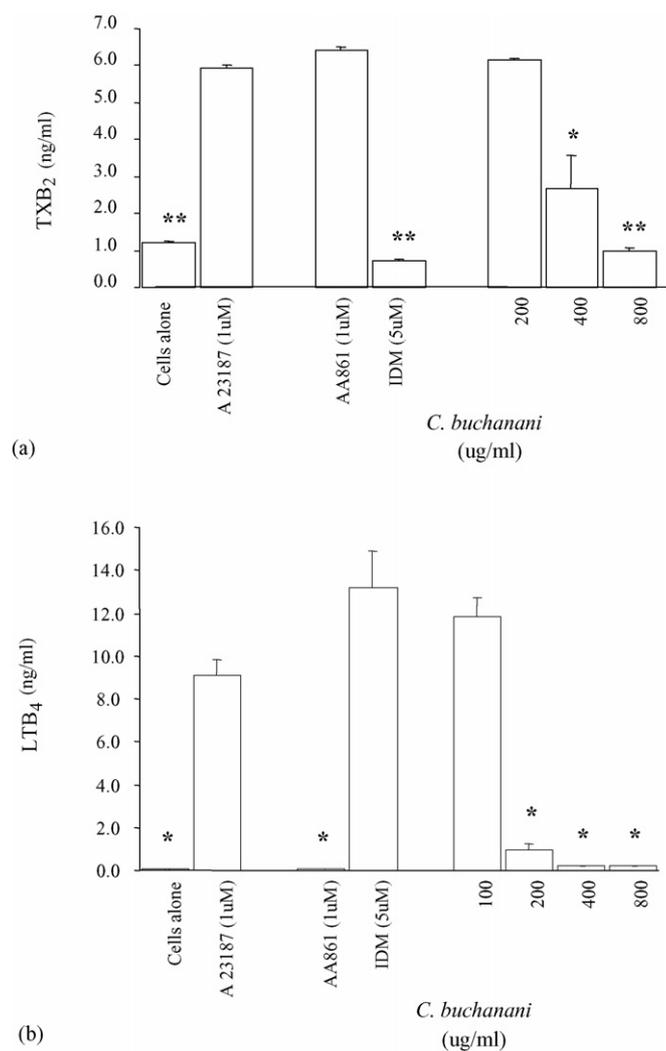


Рис. 1. Ингибирование генерации $\text{TXB}_{2(a)}$ и $\text{LTB}_{4(b)}$ в перитонеальных лейкоцитах крыс, обработанных 1 мкМ ионофора кальция A23187, 50% этанольным экстрактом *Cryptolepis buchanani* и эталонами: ингибитором циклооксигеназы (индометацином, IDM) и ингибитором 5-липооксигеназы (AA 861). В столбцах приведены средние значения \pm S.E.M. Символы (***) указывают на статистически значимое ингибирование по отношению к A23187 по непарному t-тесту Стьюдента, $P \leq 0,05$ и $P \leq 0,001$, соответственно ($n=3$).

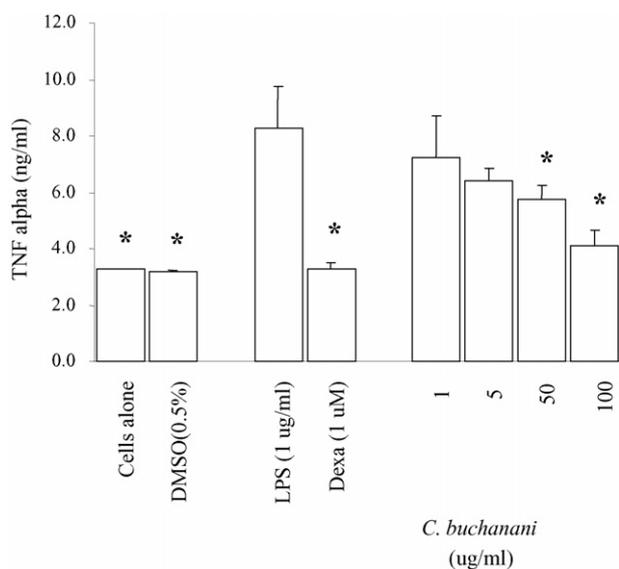


Рис. 2. Ингибирующее действие *Cryptolepis buchanani* на выработку TNF-А из клеточной линии моноцитов (клетки THP-1). Клетки THP-1 праймировали PMA (100 нМ) в течение 48 ч, затем культивировали в присутствии или в отсутствие тестируемых соединений в течение 30 мин перед стимуляцией ЛПС (1 МКГ/МЛ) в течение 24 ч. Супернатанты анализировали в трех экземплярах на TNF-А методом ELISA. Значения выражены как среднее ± S.E.M.

* $P \leq 0,05$ статистическая значимость по сравнению с контрольной группой с помощью непарного метода Стью-т-тест ($n=3$). Декса - дексаметазон (1 МКМ).

ингибитор, 5 МКМ) вызвал подавление уровня TXB_2 , в то время как подавление LTB_4 было вызвано AA 861 (ингибитор 5-LO, 1 МКМ). Клетки, предварительно обработанные 50%-ным этанольным экстрактом *Cryptolepis buchanani*, продемонстрировали сходное ингибирующее действие на пути ЦОГ и 5-LO, что привело к подавлению TXB_2 (рис. 1а) и LTB_4 (рис. 1б) в дозозависимой манере. Примечательно, что при самой высокой дозе (800 МКГ/МЛ) ингибирующий эффект экстракта был аналогичен индометацину и AA 861 в отношении продуктов ЦОГ и 5-LO, соответственно.

4.2. Влияние растительного экстракта на выработку TNF-а

Результаты обработки ЛПС-стимулированной моноцитарной клеточной линии (клетки THP-1) различными концентрациями 50%-ного этанольного экстракта *Cryptolepis buchanani* в диапазоне доз 1-100 МКГ/МЛ представлены на рис. 2. Экстракт растения значительно подавлял выработку TNF-А в дозозависимой манере. Ингибирующий эффект *Cryptolepis buchanani* (100 МКГ/МЛ) и дексаметазона (1 МКМ) составил 52,19 и 60,17 %, соответственно.

4.3. Влияние растительного экстракта на отек задней лапы крысы

В случае отека лапы, вызванного каррагинаном, наблюдалось постепенное увеличение объема отека лапы в контрольной группе в течение всего эксперимента (3 ч). Значительное уменьшение отека в зависимости от дозы наблюдалось у животных, предварительно обработанных внутрибрюшинным введением экстракта, в то время как при пероральном введении ингибирующего эффекта не наблюдалось (табл. 1).

Таблица 1
Влияние 50% этанольного экстракта *Cryptolepis buchanani* на отек лапы крысы, вызванный каррагинаном

Эксперименты	Объем отека (мл), среднее ± S.E.M.		
	1h	2h	3h
Управление	0.29 ± 0.04	0.53 ± 0.05	0.65 ± 0.04
АСА (300 мг/кг, п.о.)	0.06 ± 0.01**	0.14 ± 0.03**	0.29 ± 0.05**
<i>Cryptolepis buchanani</i>			
1000 (мг/кг, п.о.)	0.32 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.70 ± 0.04
100 (мг/кг, внутривенно)	0.23 ± 0.03	0.42 ± 0.049	0.53 ± 0.05*
250 (мг/кг, внутривенно)	0.17 ± 0.02*	0.39 ± 0.01**	0.57 ± 0.02*
500 (мг/кг, внутривенно)	0.13 ± 0.02**	0.30 ± 0.04**	0.47 ± 0.06**

Препараты вводили за 60 мин до субплантарной инъекции каррагинана. Изменение объема подушечек стоп определяли через 1, 2 и 3 ч после введения раздражителя. Каждое значение представляет собой среднее ± S.E.M. от шести крыс в группе. Статистически значимая разница по сравнению с контролем выражена * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,001$ (непарный *t*-тест Стьюдента).

4.4. Влияние растительного экстракта на грануляционную ткань, вызванную хлопковой нитью, у крысы

В модели воспаления, вызванного хлопковой нитью, 50% этанольный экстракт *Cryptolepis buchanani* в дозе 300 мг/кг внутривенно и 1000 мг/кг внутривенно проявил противовоспалительную активность (рис. 3). Через 7 дней средний сухой вес грануло-матозной ткани, окружающей нити, был значительно ниже в группе, получавшей экстракт, по сравнению с контрольной группой. Значительная противовоспалительная активность была также продемонстрирована при использовании дексаметазона в дозе 1 мг/кг в/в, который использовался в качестве контрольного контроля.

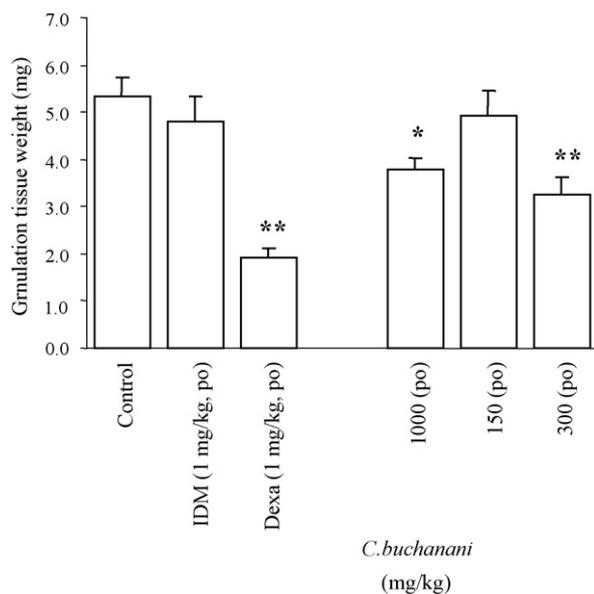


Рис. 3. Влияние 50% этанольного экстракта *Cryptolepis buchanani* на грануляционную ткань, вызванную хлопковой нитью. Животных предварительно обрабатывали различными концентрациями экстракта и эталонных препаратов за 60 минут до подкожной хлопковой нити (2 см, 7 мг) в спинной мозг крысы и один раз в день в течение последующих шести дней подряд. Крыс приносили в жертву через 7 дней после имплантации хлопка и определяли вес грануляционной ткани, как описано в разделе 2. Значения являются средними ± S.E.M. шести крыс. Статистическая значимость представлена * $P \leq 0,05$ и ** $P \leq 0,001$, соответственно (непарный *t*-тест Стьюдента).

Таблица 2

Смертность мышей регистрировали в течение 7 дней после однократного введения дозы *Cryptolepis buchanani* (n= 6).

Вещество	Путь	Доза (мг/кг)	Количество смертей/шесть мышей
<i>Cryptolepis</i>	п.о.	1000	-/6
	и.п.	200	-/6
	и.р.	400	-/6
<i>бучанани</i>	и.р.	800	2/6
	и.п.	1000	6/6

4.5. Острая токсичность

Пероральная обработка мышей 50%-ным этанольным экстрактом до 1000 мг/кг (примерно эквивалентно 12 г/кг высушенного порошка сырья) не выявила явных изменений в поведении после введения в течение 7 дней (табл. 2). Смертельную дозу или LD₅₀ определить не удалось, так как самая высокая испытанная доза не вызвала смертности. Напротив, эффекты гиперчувствительности (тремор и шерсть) наблюдались у всех животных в течение 2 ч после внутрибрюшинного введения. Доза 800 мг/кг внутривенно вызвала смерть у трети (33%) животных в течение 2 ч, в то время как при дозе 1000 мг/кг внутривенно наблюдалась 100% смерть. На основании этих данных расчетная LD₅₀ составила 900 мг/кг, что эквивалентно 12 г/кг высушенного порошка. В соответствии с таблицей токсичности (Gosselin et al., 1984), экстракт был классифицирован как нетоксичное вещество (при пероральном введении) или слаботоксичное (при внутрибрюшинном введении). Кроме того, макроскопическое исследование грубых повреждений в органах при вскрытии не выявило каких-либо изменений, связанных с применением экстракта.

5. Обсуждение и заключение

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что 50-процентный этанольный экстракт стеблей *Cryptolepis buchanani* обладает противовоспалительной активностью. Экстракт был протестирован на стандартных моделях острого и хронического воспаления. Для модели острого воспаления был проведен тест *in vitro* с использованием модели крысиных лейкоцитов, стимулированных ионофором кальция A23187. Было обнаружено, что экстракт ингибирует TXB₂ и LTB₄, продукты арахидоновой кислоты, опосредованные путями COX и 5-LO, соответственно. Путь ЦОГ приводит к образованию простагландинов и тромбоксанов, которые опосредуют боль и отек, связанные с воспалением, а путь 5-LO приводит к образованию лейкотриенов, включая хемоаттрактант лейкоцитов LTB₄. Этот результат позволяет предположить, что экстракт ингибирует как ЦОГ, так и 5-LO пути, что отличается от стандартных нестероидных противовоспалительных препаратов и, вероятно, объясняет его противовоспалительный эффект. Ингибирующее действие экстракта на метаболизм арахидоната было подтверждено на модели отека лапы крысы. Настоящее исследование показывает, что 50% этанольный экстракт стебля *Cryptolepis buchanani*, особенно в высокой дозе (500 мг/кг внутривенно), оказывает ингибирующее действие на формирование отека как в ранней, так и в поздней фазах модели отека лапы крысы, вызванного каррагинаном. Аспирин, ингибитор ЦОГ, в дозе 300 мг/кг внутривенно, заметно уменьшал отек лапы. Отек лапы, вызванный субплантарным введением каррагинана крысам, имеет двухфазный характер;

Ранняя фаза включает высвобождение серотонина, гистамина и кининов, в то время как поздняя фаза опосредована простагландинами (Vinegar et al., 1969). Этот результат позволяет предположить, что

ингибирующее действие экстракта на образование отеков является проба- в основном за счет ингибирования синтеза и/или высвобождения этих медиаторов, особенно продукты циклооксигеназы.

При хроническом воспалении ЛПС-стимулированные моноциты и Грануляция, вызванная хлопковой нитью, использовалась как *in vitro*, так и *in vivo*, соответственно. Активированные моноциты могут выделять ряд провоспалительных цитокинов, включая ФАКТОР некроза опухоли-α (TNF-α). Поэтому высвобождение TNF-α после стимуляции моноцитов ЛПС является валидной модельной системой для тестирования новых соединений на потенциальное противовоспалительное действие (Singh et al., 2005). В настоящей работе было продемонстрировано дозозависимое ингибирующее действие экстракта на высвобождение TNF-α из ЛПС-стимулированной линии моноцитарных клеток человека (THP-1). TNF-α играет важную роль как в остром, так и в хроническом воспалении (Holtmann and Neurath, 2004). TNF-α способствует инфильтрации воспалительных клеток, способствуя адгезии нейтрофилов и лимфоцитов к эндотелиальным клеткам (Dore and Sirois, 1996). Кроме того, TNF-α стимулирует нейтрофилы к транскрипции и высвобождению цитокинов, а также биосинтезу хемокинов (Marucha et al., 1990; Fernandez et al., 1996). Взаимодействие между этими медиаторами усиливает дальнейшие воспалительные реакции (Gouwy et al., 2005), а ингибирование высвобождения TNF-α может уменьшить тяжесть воспаления. Антихроническая воспалительная активность экстракта была также продемонстрирована в гранулемах, вызванной хлопковой нитью у крыс. Грануляция тканей, один из характерных признаков хронического воспаления, состоящий из выраженного инфильтрата макрофагов и неоваскуляризации, была вызвана подкожной имплантацией биоматериалов. Имплантированный материал вызывает воспалительную реакцию хозяина и модулирует высвобождение медиаторов воспаления, что в конечном итоге приводит к пролиферации тис-су и образованию гранул (Remes and Williams, 1992; Tang and Eaton, 1995; Hu et al., 2001). В течение первых 2 недель было продемонстрировано увеличение количества клеток и провоспалительных цитокинов, TNF-α и IL-1β (Cardona et al., 1992; Tang et al., 1998a,b; Dalu et al., 2000). Kato et al. (2002) также сообщили, что TNF-α может ускорять ангиогенез и деградацию матрикса за счет индукции фактора роста эндотелия сосудов и различных матричных металлопротеиназ. Поэтому ингибирование тканевой гранулемы экстрактом, по крайней мере частично, может происходить через вмешательство в высвобождение TNF-α.

Токсикологические исследования *in vivo* 50% этанольного экстракта *Cryp-*

tolepis buchanani дали противоположные результаты в зависимости от способа введения. Настоящее исследование показало, что пероральная обработка мышей экстрактом не вызвала смертности или значительных клинических симптомов токсичности, в то время как внутрибрюшинное введение чрезвычайно высокой дозы (800 и 1000 мг/кг) вызвало токсический эффект, приведший к смерти 33 и 100% животных, соответственно. Хотя соединение, ответственное за этот эффект, не было идентифицировано, эффект может быть вызван кар- денолидами, мощным положительным инотропным агентом, который содержится в *Cryptolepis buchanani* (Rao and Banning, 1990a,b).

В заключение следует отметить, что 50-процентный этанольный экстракт из стеблей *Cryptolepis buchanani* обладает противовоспалительной активностью в семи моделях. На данном этапе исследования механизм действия

Действие не совсем ясно, но оно может быть связано с ингибирующим эффектом экстракта на активацию лейкоцитов, что приводит к снижению высвобождения медиаторов воспаления и провоспалительных цитокинов, а также к облегчению воспаления как в моделях острого, так и хронического воспаления на животных. Эти результаты подтверждают эффективность *Cryptolepis buchanani* в борьбе с воспалением через многоуровневую регуляцию воспалительных реакций. Еще одной важной особенностью *Cryptolepis buchanani* является его низкая токсичность, особенно при пероральном приеме, что способствует клиническим испытаниям этого экстракта на людях. Однако перед этим необходимо провести субхронические и хронические токсикологические исследования на животных. Необходимы дальнейшие исследования для определения активных компонентов, ответственных за противовоспалительную активность *Cryptolepis buchanani*.

Благодарности

Данная работа была частично поддержана Фондом приглашенных исследований медицинского факультета Университета Кхон Каен. Авторы выражают благодарность доктору Арунпорну Итхарату, факультет фармакогнозии и фармацевтической ботаники, Университет Принца Сонгкла, Хат Яй, Таиланд, за идентификацию растений и предоставление растительных материалов. Авторы выражают благодарность профессору Киту Годфри и профессору Питеру Хоутону за ценные предложения.

Ссылки

- Кардона, М.А., Симмонс, Р.Л., Каплан, С.С., 1992. Выработка TNF и IL-1 человеческими моноцитами в ответ на биоматериалы. Журнал исследований биомедицинских материалов 26, 851-859.
- Колдиц, И.Г., 1985. Маргинация и эмиграция лейкоцитов. Обзор и синтез патологических исследований 4, 44-68.
- Dalu, A., Blaydes, B.S., Lomax, L.G., Delclos, K.B., 2000. Сравнение воспалительной реакции на имплантат из полидиметилсилоксана у самцов и самок мышей Balb/c. Biomaterials 21, 1947-1957.
- Dore, M., Sirois, J., 1996. Регуляция экспрессии Р-селектина медиаторами воспаления в эндотелиальных клетках яремной ямки собаки. Ветеринарная патология 33, 662-671.
- Fernandez, M.C., Walters, J., Marucha, P., 1996. Транскрипционная и пост-транскрипционная регуляция GM-CSF-индуцированной экспрессии гена IL-1 beta в PMN. Journal of Leukocyte Biology 59, 598-603.
- Гош, А.К., Хирасава, Н., Ли, Й.С., Ким, Й.С., Шин, К.Х., Рю, Н., Охучи, К., 2002. Ингибирование сульфатом ахарана ангиогенеза в экспериментальных моделях воспаления. British Journal of Pharmacology 137, 441-448.
- Госселин, Р.Е., Смит, Р.П., Ходж, Х.К., 1984. Клиническая токсичность коммерческих продуктов. Уильям и Уилкинс, Балтимор.
- Gouwy, M., Struyf, S., Proost, P., Van Damme, J., 2005. Синергия в сетях цитокинов и хемокинов усиливает воспалительный ответ. Обзоры факторов роста цитокинов 16, 561-580.
- Хольтманн, М.Х., Нейрат, М.Ф., 2004. Дифференциальная TNF-сигнализация при хронических воспалительных заболеваниях. Current Molecular Medicine 4, 439-444.
- Hu, W.J., Eaton, J.W., Ugarova, T.P., Tang, L., 2001. Молекулярные основы реакций на инородные тела, опосредованных биоматериалами. Кровь 98, 1231-1238.
- Kasama, T., Strieter, R.M., Standiford, T.J., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., 1993. Экспрессия и регуляция человеческого нейтрофил-производного макрофагального белка 1 альфа. Журнал экспериментальной медицины 178, 63-72.
- Kasama, T., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., Lincoln, P.M., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., 1995. Интерферон гамма модулирует экспрессию нейтрофилов-производные хемокинов. Журнал исследовательской медицины 43, 58-67.
- Като, Т., Харо, Х., Комори, Х., Шиномия, К., 2002. Последовательная динамика экспрессии матриксных металлопротеиназ, ФАКТОРА некроза опухоли- α , фактора роста эндотелия сосудов и плазмина в процессе резорбции грыжи диска. The Spine Journal 2, 106.
- Лаупатгаракасем, П., Хоутон, П.Дж., Хоулт, Дж.Р., Итарат, А., 2003. Оценка активности, связанной с воспалением, четырех растений, используемых в Таиланде для лечения артрита. Журнал этнофармакологии 85, 207-215.
- Marucha, P.T., Zeff, R.A., Kreutzer, D.L., 1990. Цитокиновая регуляция экспрессии гена IL-1 beta в полиморфноядерных лейкоцитах человека. Журнал иммунологии 145, 2932-2937.
- Moroney, M.A., Alcaraz, M.J., Forder, R.A., Carey, F., Hoult, J.R., 1988. Селективность ингибирования 5-липооксигеназы и циклооксигеназы нейтрофилов противовоспалительным флавоноидным гликозидом и родственными агликонами флавоноидов. Журнал фармации и фармакологии 40, 787-792.
- Пантхонг, А., Канджаналоти, Д., Тейлор, В.К., 1986. Этноботанический обзор лекарственных растений из тайских традиционных книг. Часть I. Растения с противовоспалительными, противоастматическими и антигипертензивными свойствами. Журнал этнофармакологии 18, 213-228.
- Rao, V.R., Banning, J.W., 1990a. Взаимодействие криптозина с сердечными бета-адренорецепторами млекопитающих. Drug and Chemical Toxicology 13, 173-194.
- Rao, V.R., Banning, J.W., 1990b. Взаимодействие криптозина с дигидропиридин-специфическими кальциевыми каналами мамы-малианского сердца. Life Sciences 47, 1667-1676.
- Ремес, А., Уильямс, Д.Ф., 1992. Иммунный ответ в биосовместимости. Biomaterials 13, 731-743.
- Сингх, У., Табибиан, Ж., Венугопал, С.К., Деварадж, С., Джиалал, И., 2005. Разработка скринингового анализа in vitro для проверки противовоспалительных свойств пищевых добавок и фармакологических агентов. Клиническая химия.
- Tang, L., Eaton, J.W., 1995. Воспалительные реакции на биоматериалы. Американский журнал клинической патологии 103, 466-471.
- Tang, L., Jennings, T.A., Eaton, J.W., 1998a. Тучные клетки опосредуют острую воспалительную реакцию на имплантированные биоматериалы. Труды Национальной академии наук Соединенных Штатов Америки 95, 8841-8846.
- Tang, L., Liu, L., Elwing, H.B., 1998b. Активация комплемента и воспаление, вызванные поверхностями модельных биоматериалов. Журнал исследований биомедицинских материалов 41, 333-340.
- Уксус, Р., Шрайбер, В., Хьюго, Р., 1969. Двухфазное развитие каррагенинового отека у крыс. Журнал фармакологии и экспериментальной терапии 166, 96-103.
- Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Каррагенин-индуцированный отек задней лапы крысы как тест для противовоспалительных препаратов. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine 111, 544-547.