

EWA SKOPIŃSKA-RÓŻEWSKA, JANUSZ BANY, EWA SOMMER,
DANUTA ZDANOWSKA, MAŁGORZATA FILEWSKA, HENRYK SKURZAK

Działanie biologiczne wodnego ekstraktu ziela jeżówki purpurowej (preparat Echinerbera)

Wprowadzenie

Echinacea purpurea(L.) Moench (Asteraceae) należy do roślin najczęściej stosowanych w fitoterapii schorzeń infekcyjnych, głównie dróg oddechowych. Ojczyzną tej rośliny, jak również kilku innych jej odmian i gatunków, są prairie i pustkowia Ameryki Północnej, a odkrycie jej właściwości leczniczych zawdzięczamy szamanom plemion indiańskich. Indianie stosowali jeżówki jako lek na wszystkie dolegliwości - od chorób skóry począwszy, na schorzeniach przewodu pokarmowego skończywszy. Leczyli jeżówką ukąszenia węży i jadowitych owadów, choroby weneryczne, wszelkiego rodzaju infekcje i trudno gojące się rany, choroby zakaźne, nosaciznę u koni. Odkryli również jej właściwości przeciwbólowe.

Biali osadnicy początkowo byli nieufni, wkrótce jednak zaczęli naśladować Indian, stosując jeżówkę najpierw w leczeniu zwierząt (m.in. miejscowo w odparzeniach skóry u koni, spowodowanych siodłem) a później i u ludzi. Przystojona przez białych osadników wiedza Indian amerykańskich niebawem dotarła do Europy.

W epoce burzliwego rozwoju chemioterapii oficjalna medycyna straciła zainteresowanie roślinami leczniczymi, w tym jeżówkami, mimo iż rozpoczęto ich systematyczne badania. Wyniki tych badań były jednak na tyle obiecujące, że od lat 70. ubiegłego stulecia obserwuje się ponowny wzrost zainteresowania tymi roślinami. Wielu badaczy wykazało wielokierunkowe działanie soku i wyciągów z ziela jeżówki purpurowej na reakcje odpornościowe. Pomimo wyizolowania z nich frakcji wykazujących działanie immunotropowe, uważa się (Bauer i Wagner 1989), że aktywność immunostymulująca tych wyciągów jest wypadkową działania wielu związków w nich obecnych. Wyciągi wodne różnią się składem od alkoholowych, dominują w nich polisacharydy i flawonoidy.

Pomimo udowodnionego doświadczalnie i klinicznie działania immunotropowego jeżówki purpurowej, pojawiają się stale badania kliniczne wykazujące brak jej aktywności u ludzi. Analiza piśmiennictwa pozwala wyjaśnić tę zagadkę. Wbrew zdrowemu rozsądkowi i istniejącym w literaturze badaniom wykazującym niezbicie, że jeżówka działa na układ odpornościowy korzystnie w niskich dawkach i podawana przez krótki okres, niektórzy klinicyści uparcie prowadzą badania wielotygodniowe, podając zbyt duże dawki.

Takie działanie prowadzi do stymulacji mechanizmów supresyjnych i jest wysoce szkodliwe. W tabelach 1 i 2 podano część danych literaturowych na ten temat. Należy więc pamiętać, że jeżówki są immunomodulatorami, mogą pobudzać lub hamować aktywność komórek układu odpornościowego. Każdy preparat jest inny, każdy wymaga przebadania w celu ustalenia optymalnego dawkowania u ludzi. Nasz zespół posiada duże doświadczenie, ponieważ od wielu lat prowadzimy kontrolne badania dotyczące aktywności biologicznej leków jedno- i wieloskładnikowych, zawierających jeżówki.

Badania Echinerberby

Celem przedstawianej pracy doświadczalnej była ocena niektórych właściwości biologicznych sproszonego wyciągu wodnego ziela Echinacea purpurea (produkt Echinerbera-Labofarm).

Interesowały nas dwa zagadnienia:

- wpływ podawania preparatu in vivo na wybrane mechanizmy odporności nieswoistej u myszy;
- wpływ na aktywność angiogenną komórek nowotworu mysiego.



Tabela 1.
Badania kliniczne
(dane z piśmiennictwa)

Profilaktyczne podawanie wysokich dawek przez wiele tygodni nie wywierało żadnego efektu na częstość infekcji dróg oddechowych i osłabiało, a nie pobudzało odporność.

Potwierdziły to nasze badania doświadczalne

Podając różne preparaty jeżówek myszom w małych dawkach, przez kilka dni, uzyskaliśmy bardzo dobrą stymulację odporności nieswoistej (granulocyty) i swoistej (limfocyty, przeciwciała). Potwierdziliśmy te wyniki podając sok z jeżówki zdrowym ochotnikom przez 7 dni.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na myszach szczepu Balb/c obu płci, w wieku 7-9 tygodni, wagi ok. 20 g, pochodzących z hodowli Państwowego Zakładu Higieny (materiał zarodowy z Centrum Onkologii w Warszawie) oraz hodowli własnej (materiał zarodowy z Centrum Onkologii).

Podawano zwierzętom preparat Echinierba doustnie, przy użyciu pipety Eppendorfa, w dawkach dobowych 600 lub 1200 mikrogramów i objętości 40 mikrolitrów. Myszy grupy kontrolnej otrzymywały wodę. Powyższe dawki odpowiadają, po przeliczeniu uwzględniającym różnice pomiędzy człowiekiem i myszą, dotyczące stosunku powierzchni ciała do jego masy, dawkom 300 i 600 mg podanym człowiekowi o wadze 70 kg. Myszy karmiono przez 7 dni przed przeprowadzeniem doświadczeń (badania odporności komórkowej i wpływu na zakażenie bakteryjne) lub przez 3 dni po przeszczepieniu komórek nowotworowych (badanie wpływu na aktywność angiogenną komórek nowotworowych).

W badaniach zastosowano następujące testy:

1. Badanie aktywności chemokinetycznej limfocytów śledzionowych ex vivo metodą Sandberga (hodowla in vitro).
2. Badanie aktywności angiogennej limfocytów śledzionowych ex vivo testem skórnej angiogenezy (test LIA).
3. Badanie aktywności metabolicznej granulocytów metodą chemiluminescencji.
4. Test skórnej angiogenezy indukowanej u myszy, wszczepieniem komórek nowotworowych mięsaka mysiego L-1 (3-dniowy test in vivo).
5. Test odporności na zakażenie bakteryjne *Pseudomonas aeruginosa*.

Część I

Badanie immunotropowego działania Echinierba u myszy

Po 7 dniach podawania leku myszy usypiano letalną dawką Morbitalu i pobierano krew i śledziony do dalszych badań. Zawiesiny komórek przygotowywano w sposób rutynowy, jałowo, przecierając narządy przez gazę młyńską i wirując na Histopaque-1077, w celu usunięcia erytrocytów.

Ocena aktywności chemokinetycznej komórek śledziony testem migracji in vitro (1, 2).

Metoda Sandberga w modyfikacji własnej. W skrócie: przygotowano zawiesinę o gęstości 30 mln komórek w 1 ml środowiska hodowlanego Parkera,

zawierającego 5% cielejcej surowicy płodowej (FCS). Napełniano szklane kapilary, zaklejano jeden koniec, wirowano przez 5 minut przy 450 g, a następnie kapilary umieszczano na szklanych płytkach, zaznaczano wysokość słupka komórek w poszczególnych rurkach i inkubowano przez 24 godziny (37°C, 5% CO₂).

Długość drogi migracji komórek odczytywano przy pomocy powiększalnika fotograficznego (powiększenie 6,5 razy) i wyrażano w jednostkach migracyjnych (l.j.m.=0,18 mm).

Badanie wpływu na spontaniczną aktywność angiogenną komórek śledziony (3,4).

Zastosowano model reakcji lokalnej według Sidky i Auerbacha. W skrócie: zawiesiny splenocytów myszy karmionych Echinierbą przez 7 dni wszczepiano śródskórnie w kilka miejsc w liczbie 10⁶ komórek na jeden wszczep w ogolone boki grzbietu uspiomych wrodzianem chloralu myszy Balb/c.

Odczytu dokonywano po 72 godzinach w mikroskopie operacyjnym, po uśmierceniu myszy Morbitalem, na wewnętrznej powierzchni skóry. Liczono nowopowstałe naczynia krwionośne w 1/3 pola widzenia pod powiększeniem 6 razy, stosując kryteria autorów metody (krótkie, kręte, rozgałęzione, skierowane do miejsca wszczepu komórek).

Ocena aktywności chemiluminescencyjnej granulocytów krwi stymulowanych zymosanem według metody opisanej (5).

Aktywność chemiluminescencyjną mierzono w liczniku scyntylicyjnym i wyrażano w wartościach cpm na 1000 granulocytów. Metoda ta pozwala na ocenę zdolności granulocytów obojętnochłonnych krwi do zabijania drobnoustrojów w mechanizmie powstawania wolnych rodników tlenowych.

Statystyczną istotność różnic pomiędzy grupami oceniano testem t Studenta i testem Manna-Whitneya.

Część 2

Badanie wpływu Echinierby na aktywność komórek nowotworowych.

Linie komórkową L-1 Sarcoma otrzymano z banku komórek Centrum Onkologii i pasażowano początkowo in vitro, a następnie in vivo na myszach Balb/c. Do doświadczeń użyto komórek uzyskanych z guzów po pierwszym pasażu in vivo.

Zawiesiny komórek przygotowywano z guzów usuwanych 14 dnia po wszczepieniu 1 mln komórek w okolicę podłopatkową. Guzy przecierano przez metalowe sito, otrzymaną zawiesinę przesączało przez

Tabela 2.
Badania kliniczne
(dane z piśmiennictwa)

Podawanie w trakcie infekcji, średnie dawki.

Barret 1999
wyniki pozytywne

Lindemuth 2000
wyniki pozytywne

Giles 2000
(przegląd literatury w latach 1961-2000):
15 wyników pozytywnych,
2 negatywne

Shulten 2001
wyniki pozytywne



gazę młyńską, płukano dwukrotnie, wirując przez 10 minut przy 300 g i zawieszano w płynie Parkera. Zawiesiny komórek guzów, przygotowane jak wyżej, wszczepiano myszom śródskórnie.

Test skórnej angiogenezy metodą opisaną przez Sidky i Auerbacha w modyfikacji własnej (6).

W skrócie: myszy usypiano wodzianem chloralu. Zawiesiny komórek wszczepiano śródskórnie (200 tys. komórek w 0,05 ml) w 3-6 miejsc na огоłonej powierzchni grzbietu. Po 72 godzinach myszy usypiano letalną dawką Morbitalu i dokonywano odczytu angiogenezy na wewnętrznej powierzchni skóry, w mikroskopie operacyjnym, licząc nowotworzone naczynia krwionośne (krótkie, kręte, rozgałęzione, skierowane do miejsca wszczepu komórek).

Część 3

Badanie wpływu Echinery na zakażenie bakteryjne (7). Rozwój infekcji *P. aeruginosa*.

Badania prowadzono na myszach Balb/c. Grupy doświadczalne liczyły po 5 osobników płci męskiej w wieku 7-9 tygodni. Zwierzęta otrzymywały per os przez 7 dni, raz dziennie, 40 mikrolitrów preparatu Echinery (1200 lub 600 mcg) rozpuszczonego w wodzie destylowanej. Myszy grupy kontrolnej otrzymywały wodę destylowaną. Po 7 dniach podawania preparatu zwierzęta zarażano dootrzewnowo bakteriami (*P. aeruginosa*). Na 2 dni przed zarażeniem przygotowywano bakterie. W celu ożywienia, przeszczepiano bakterie ze skosu agarowego do bulionu odżywczego BHI i po 24 godzinach inkubacji w 37° C ponownie przesiewano na skos agarowy. Następnie przygotowywano zawiesinę *P. aeruginosa*, splukując ze skosu bakterie roztworem PBS. Myszy zarażano dootrzewnowo, podając 0,1 ml zawiesiny bakterii ($3,2 \times 10^7$ CFU na mysz). Po 4 godzinach od podania *P. aeruginosa* myszy usypiano i izolowano wątrobę. Wyizolowaną wątrobę ważono, homogenizowano w szklanych homogenizatorach i wysiewano ilościowo (w rozcieńczeniach 10-krotnych) na stałe podłoże do hodowli *Pseudomonas* (Cetrymide agar, Merck). Po inkubacji przez 24 godziny w 37° C odczytywano liczbę kolonii bakterii (CFU). Wyniki przedstawiono jako liczbę bakterii na 1 gram tkanki wątroby.

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono za zgodą lokalnych Komisji Etycznych.

Analiza statystyczna – wyniki opracowano przy użyciu testu t Studenta i testu U Manna-Whitneya.

Omówienie wyników

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania lekami pochodzenia naturalnego, posiadającymi aktywność immunotropową. Mogą one stanowić cenne uzupełnienie terapii schorzeń infekcyjnych, podnosząc odporność komórkową i humoralną organizmu. Mogą również znaleźć zastosowanie u chorych z nowotworami, poddawanych chemioterapii i radioterapii.

Jednakże immunostymulator podawany tej grupie chorych nie powinien pobudzać wzrostu nowotworu ani jego unaczynienia, ponieważ angiogeneza jest jednym z najważniejszych czynników związanych z rozwojem i rozprzestrzenianiem się guzów nowotworowych.

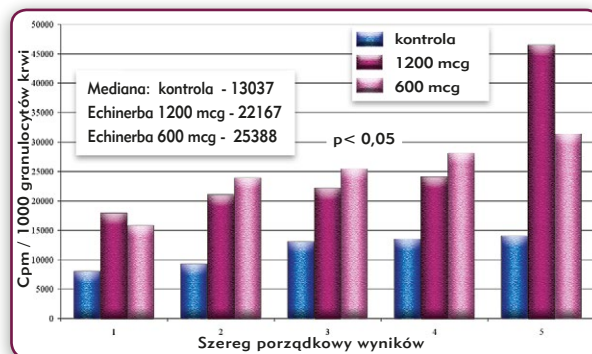
Immunomodulujące działanie wyciągów roślinnych polega między innymi na ich wpływie na metabolizm komórek układu odpornościowego, takich jak limfocyty, granulocyty, makrofagi.

Granulocyty stanowią pierwszy układ obrony układu odpornościowego, niezwykle istotny dla odporności przeciwbakteryjnej. Preparat Echinery silnie pobudził ich zdolność do zabijania tlenowego bakterii, co stwierdziliśmy stosując test chemiluminescencji, oraz test odporności przeciwbakteryjnej w stosunku do groźnego patogenu jakim jest *Pseudomonas aeruginosa*. W tym ostatnim teście silniejszy efekt obserwowano przy niższej dawce. (rys. 1, rys. 2).

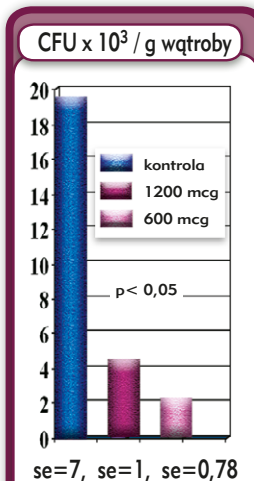
Pseudomonas aeruginosa jest Gram-ujemną pałeczką tlenową, zwaną pałeczką ropy błękitnej i jest postrzegana jako szczególnie groźny drobnoustrój. U ludzi z chorobą nowotworową lub po chemioterapii, u pacjentów oddziałów hematologicznych oraz u chorych po rozległych oparzeniach lub zranieniach, stwierdza się zaburzone funkcje układu immunologicznego, zwłaszcza występowanie neutropenii. W takich warunkach łatwo dochodzi do oportunistycznego zakażenia *P. aeruginosa*.

Opracowany przez nas model infekcji dootrzew-

Rys. 1.
Wpływ karmienia myszy Echinerybą na aktywność chemiluminescencyjną granulocytów krwi



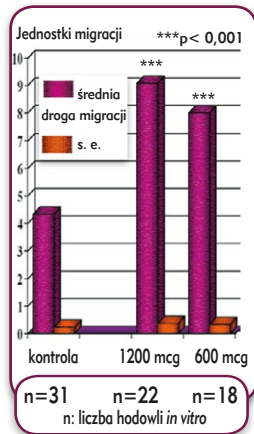
Rys. 2.
Wpływ karmienia myszy Echinerybą na ich odporność przeciwbakteryjną



Liczba myszy: 5, 5, 5

- Myszy karmiono przez 7 dni Echinerybą w dawce dobowej 1200 i 600 mcg.
- Ósmego dnia zarażano myszy *Pseudomonas aeruginosa*, dawką $3,2 \times 10^7$ CFU/mysz
- po 4 godzinach pobierano wątroby do badania mikrobiologicznego
- (posiewy)

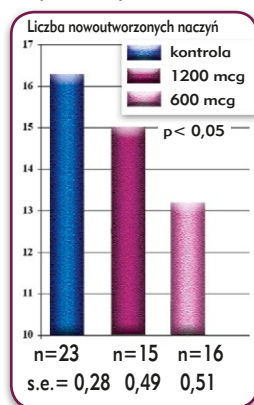
Rys. 3. Wpływ karmienia myszy *Echinerbą* na aktywność chemokinetyczną komórek śledziony.



Rys. 4. Tumour – induced angiogenesis (T IA)



Rys. 5. Odczyn skórnej angiogenezy indukowany u myszy wszczepieniem komórek syngenicznego mięsaka L-1. Mysiom podawano *Echinerbę* przez 3 dni po wszczepieniu komórek.



nowej *Pseudomonas aeruginosa* jest dobrym układem doświadczalnym do oceny jej rozwoju i badań, m.in. immunologicznych i histologicznych. (Bany i wsp. 2001).

Ruch komórek jest jednym z pierwszych sygnałów ich aktywacji, czyli gotowości organizmu do obrony immunologicznej. Czynniki wzbudzające nieukierunkowany ruch komórek (chemokineza) powodują wzrost metabolizmu komórkowego i indukują uwalnianie mediatorów z aktywowanych komórek. Komórkami układu immunologicznego, obdarzonymi zdolnością ruchu, są makrofagi i monocyty, a także granulocyty i limfocyty. Te ostatnie komórki zastosowaliśmy do badania udziału preparatu *Echinerba* w procesie aktywacji limfocytów, komórek ważnych dla rozwoju swoistej odporności na patogeny. Preparat *Echinerba* w obu dawkach silnie stymulował ten parametr aktywności komórkowej, czego wyrazem była istotnie wyższa aktywność chemokinetyczna limfocytów izolowanych ze śledziony myszy karmionych *Echinerbą* w stosunku do myszy grupy kontrolnej. (rys. 3). Badania prowadzone w teście angiogenezy skórnej nie wykazały istotnego wpływu na zdolność limfocytów śledzionowych do spontanicznej produkcji angiogennych czynników wzrostowych oraz istotnego hamowania odczynu angiogenezy nowotworowej przez niższą dawkę *Echinerby* (odpowiadającą 300 mg podanym człowiekowi o wadze 70 kg) w doświadczeniach, w których do indukcji angiogenezy skórnej stosowano komórki izolowane z mięsaka mysiego L-1 Sarcoma, nowotworu syngenicznego dla myszy Balb/c (rys. 4 i 5). Angiogeneza, czyli tworzenie naczyń krwionośnych na bazie już istniejących, w warunkach fizjologicznych, jest motorem rozwoju tkanek i narządów w życiu płodowym, odgrywa ważną rolę w procesach gojenia i regeneracji oraz w cyklu rozrodczym. W warunkach patologicznych dochodzi do zaburzenia mechanizmów regulacyjnych, co manifestuje się niedoborem lub nadmiarem stymulatorów lub inhibitorów angiogenezy. W zależności od rodzaju niedoboru mamy do czynienia z chorobami niedokrwiennymi i zaburzeniami procesów regeneracji, z jednej strony, lub z niekontrolowanym rozwojem patologicznych naczyń, które to zjawisko obserwujemy w przewlekłych chorobach zapalnych, retinopatiach oraz w rozwoju nowotworu i jego przerzutów. Badania nad poszukiwaniem skutecznych inhibitorów tego zjawiska prowadzone są od wielu lat, między innymi wśród substancji pochodzenia naturalnego. Stąd

wszystkie preparaty ziołowe, które posiadają zdolność hamowania angiogenezy nowotworowej, mogą stać się ważnym źródłem takich inhibitorów. Przeprowadzone przez nas badanie sugeruje taką możliwość w przypadku preparatu *Echinerba*.

Podsumowanie

Preparat *Echinerba* jest bardzo dobrym immunostymulatorem, pobudzającym aktywność metaboliczną i przeciwbakteryjną komórek układu odpornościowego. Nie pobudza aktywności angiogennej komórek nowotworowych, a w dawce 600 mcg/mysz (300mg dla człowieka) zmniejsza liczbę naczyń indukowanych przez komórki nowotworowe w teście angiogenezy skórnej. Nie powinno się przekraczać dawki 3 tabletek (300 mg) dziennie u dorosłych (1-2 u dzieci). Czas podawania nie powinien być dłuższy niż 10 dni codziennie lub 20 dni co drugi dzień. Po miesiącu kurację można powtórzyć.

prof. dr hab. n. med. **Ewa Skopińska-Różewska** - Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, prof. dr hab. n. przyr. **Janusz Bany** - Zakład Farmakologii i Toksykologii Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie, dr wet. **Ewa Sommer** - Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, mgr biol. **Danuta Zdanowska** - Zakład Farmakologii i Toksykologii Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii, **Małgorzata Filewska** - Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, dr n. med. **Henryk Skurzak** - Zakład Immunologii Centrum Onkologii w Warszawie

Piśmiennictwo

Białas-Chromiec B., Skopińska-Różewska E., Filewska M., Radomska D., Rogala E. Aktywność chemokinetyczna komórek śledziony jako bioindykator wpływu ksenobiotyków na organizm myszy [w]: Wpływ ksenobiotyków na organizm zwierząt i człowieka, pod red. A. K. Siwickiego. Wyd. IRS, Olsztyn 1999, ss. 157-161; Sandberg G. The sealed capillary migration technique and thymocyte migration in vitro. J. Immunol. Methods, 12/1976, s. 365; Sidky Y., Auerbach R. Lymphocyte-induced angiogenesis, a quantitative and sensitive assay of the graft-versus-host reaction. J. Exp. Med., 141/1975, 1084-1093; Kamiński P. i inni. The effect of salbutamol treatment on the cellular immunity of the offspring of pregnant mice: spleen celi activity. Drugs Exptl. Clin. Res, 24/1998, ss. 77-83; Kamiński P. i inni. Granulocyte chemiluminescence activity, antibody production and percentage of CD4 and CD8 lymphocytes in peripheral blood of offspring salbutamol-treated pregnant C3H mice. Pharmacological Research, 41/2000, ss. 89-94; Skopińska-Różewska E. i inni. Inhibitory effect of shark liver oil on cutaneous angiogenesis induced in Balb/c mice by syngeneic sarcoma L-1, human urinary bladder and human kidney tumour cells. Oncology Reports, 6/1999, ss. 1341-1344; Bany J. i inni. Rozwój infekcji bakteryjnej u myszy zarażonych *Trichinella spiralis* lub *Trichineta pseudospiralis*. „Wiad. Parazytol.” 47/2001, ss. 667-674. Pozostałe piśmiennictwo u Autorów. (e-mail: ewaskop@hotmail.com).