

СКРИНІНГОВІ ФАРМАКОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗРІДЖЕНОГАЗОВИХ ЕКСТРАКТІВ СУЦВІТЬ ЛИПИ

Ключові слова: протизапальна активність, фармакологічний скринінг, екстракти, суцвіття липи, зріджені гази

Розроблення нових оригінальних препаратів, особливо рослинного походження, в даний час є одним із пріоритетних напрямів вітчизняної фармації. Загальновідомо, що розробники та підприємства велику увагу акцентують на виборі найбільш раціональної лікарської форми та дозування, що в свою чергу значно залежить від фармакологічної активності вихідної субстанції.

Суцвіття різних видів липи (*Tilia Cordata*) широко використовують в народній та офіційній медицині завдяки їх різноманітній терапевтичній дії – седативній, відхаркувальній, потогінній, діуретичній, анксиолітичній та спазмолітичній [4, 10, 11, 12]. На даний час існує ряд закордонних наукових публікацій, що присвячені дослідженню переважно нейротропної активності екстрактів із вказаної сировини. Так, автори [13] показали, що витяги, одержані із суцвіть *Tilia americana* настоюванням з киплячою водою протягом 1 год, спричиняли седативний та анксиолітичний ефекти у разі перорального введення мишам в дозах від 10 до 300 мг/кг, а основними діючими речовинами були глікозиди кверцетину та кемпферолу. Згідно з даними [6] ліофілізовані водні екстракти з *Tilia europaea* в дозах 10–100 мг/кг також виявляли седативну активність в тестах на мишах.

Дослідженнями [12] було встановлено, що метанольні та гексанові екстракти із суцвіть липи американської в дозах 10–300 мг/кг значно збільшували тривалість пентобарбітал-індукованого сну у мишей вже через 15 хв після орального прийому даних субстанцій, причому за порівняння активності гексанові витяги мали у 8 разів меншу токсичність, ніж метанольні. Етилацетатний екстракт, до якого частково переходили речовини, що містилися як у гексановому, так і в метанольному, був менш активним. Автори [12] вказують на те, що за седативний ефект відповідають не тільки гідрофільні сполуки, але й ліпофільні.

В роботі [3] також встановлено, що гексановий екстракт із суцвіть липи має нейротропну дію в дозах 10–30 мг/кг за перорального введення мишам, а виділені з нього фракції, які містять β -ситостерол і деякі жирні кислоти, є відповідальними за фармакологічний ефект.

Дані літератури відносно спазмолітичної активності спирто-водних екстрактів липи є досить суперечливими. Так, наприклад, ряд авторів [5, 9] зазначають, що деякі флавоноїди та їх метильовані похідні, які, зокрема, входять також і до складу липи, викликають релаксацію гладкої мускулатури судин та кишечника. У той же час, в експериментах [8, 14] на ізольованих тканинах кишечника та аорти спостерігався ефект безпосереднього впливу етанольного та водного екстрактів із суцвіть липи на периферичні М-холінорецептори зазначених зразків, що викликало спазми мускулатури. За думкою авторів [14], спазмогенний ефект спричинювали полярні сполуки. У свою

чергу ліпофільні речовини, в тому числі ефірні олії, згідно з даними [11], виявляли діаметрально протилежну дію на кишечник щурів.

Окрім того, дослідженнями [15] виявлено селективну антипроліферативну активність дихлорометанових екстрактів з *Tilia cordata* відносно клітин лімфоми BW 5147 порівняно з нормальними лімфоцитами. Враховуючи спорідненість дихлорометану і зріджених фреонів за розчинювальною здатністю, можна передбачати, що й зрідженогазовим екстрактам притаманна аналогічна активність.

Вивчення протизапальної, анальгезуючої та жарознижувальної дії екстрактів липи дотепер практично не проводили. Співробітниками НФаУ вперше у світі були одержані ліпофільні та ліпофільно-гідрофільні комплекси із суцвіть *Tilia cordata* послідовним переробленням сировини різними зрідженими газами та їх сумішами. Автори [1] встановили протизапальний ефект дифторхлорметанового (фреонового-22) екстракту липи у разі ректального введення щурам.

Метою даної роботи є проведення скринінгових фармакологічних досліджень зрідженогазових екстрактів суцвіть липи, які перспективно включати до складу пероральних лікарських форм.

Матеріали та методи дослідження

В даній роботі для фармакологічного скринінгу було обрано наступні активні субстанції: A_0 – дифторхлорметановий (фреоновий-22) ліпофільний екстракт із суцвіть липи; B_0 – дифторметановий (фреоновий-32) витяг зі шроту після виділення зразку A_0 ; C_0 – водно-спиртовий маточник, одержаний після послідовного очищення фреоно-аміачного екстракту суцвіть липи гексаном, хлороформом й етилацетатом.

За органолептичними показниками об'єкт A_0 виглядає як суміш буро-зеленої смолистої маси із жовто-зеленими аморфними частинками, за температури 55–60 °C обидві ці фракції взаємно стоплюються, утворюючи гомогенний густий екстракт; субстанція має сильний запах, характерний для липи в період цвітіння. Об'єкт A_0 легко розчиняється у метиленхлориді, ацетоні, гексані, толуолі, частково – в етанолі, пропіленгліколі (ПГ) та поліетиленоксиді (ПЕО-400), практично нерозчинний у воді. Зразок B_0 являє собою світло-жовту пастоподібну масу із сильним ароматним запахом, яка легко розчинна в метиленхлориді, ацетоні, 70–95°-му етанолі, ПГ і ПЕО-400, помірно – в гексані й 50°-му етанолі, погано – у воді. Субстанція C_0 має смолисту консистенцію, коричневий колір, гіркий та в'язучий смак, легко розчиняється у воді, етанолі, помірно – в ацетоні.

З урахуванням вищезазначених властивостей для забезпечення зручності дозування екстракти A_0 та B_0 були змішані з інертним наповнювачем (лактозою) в розведенні 1:15 і 1:50 відповідно, утворюючи порошкові суміші (зразки А та В). Зважаючи на високу гігроскопічність субстанції C_0 та неможливість надати їй порошкоподібного стану, її досліджували у вигляді 5%-го водно-пропіленгліколевого розчину (зразок С).

Досліди здійснювали на 40 білих безпородних щурах масою 190–250 г.

Протизапальну активність об'єктів А, В і С вивчали на моделі карагенінового набряку стопи щурів, у розвитку якого беруть участь різні медіатори запалення. Набряк викликали субплантарним введенням 0,1 мл 1% розчину карагеніну.

За даними Di Rosa зі співавторами [7], у перші 30–90 хв у патогенезі розвитку набряку беруть участь гістамін і серотонін, в інтервалі між 1,5–2,5 год – кініні, а між 2,5–5,5 год – простагландини. Спектр медіаторів, які стимулюють процес ексудації за цієї моделі, дає змогу припустити механізм дії досліджуваних речовин.

Всі тварини було розподілено на 8 груп по 5 тварин в кожній. Зразки, які містили екстракти липи серцелистої, вводили в дозах 10 мг/кг і 30 мг/кг в профілактичному режимі. Контрольні тварини отримували еквівалентну кількість води. Препаратом

порівняння обрано диклофенак натрію у дозі 8 мг/кг (ЕД₅₀ на цій моделі) як стандартний протизапальний референс-препарат.

Досліджувані зразки вводили одноразово внутрішньошлунково за одну годину до ін'єкції карагеніну. Розвиток набряку оцінювали за збільшенням об'єму стопи ΔV , який вимірювали в динаміці через 1, 2, 3, 4, 5 і 6 год за допомогою механічного онкометра за А. С. Захаревським [2].

Антиексудативну (протизапальну) активність досліджуваних зразків визначали за здатністю зменшувати набряк у дослідних тварин порівняно з контрольними і розраховували за формулою:

$$\text{ПЗА} = \frac{\Delta V_k - \Delta V_0}{\Delta V_k} * 100\% \quad (1)$$

де: ПЗА – протизапальна активність зразку;

ΔV_0 – збільшення об'єму (набряк) лапи у дослідних тварин;

ΔV_k – збільшення об'єму (набряк) лапи у контрольних тварин.

Результати дослідження та обговорення

В ході проведених досліджень було встановлено, що введення розчину карагеніну призводило до набряку задніх кінцівок усіх експериментальних тварин.

Як впливає з одержаних даних (табл. 1), застосування досліджуваних об'єктів спричинювало зменшення набряку кінцівок у тварин, але механізми дії істотно відрізнялися.

У першу годину експерименту достовірного відхилення не було виявлено майже в жодній із дослідних груп. Виключення становили тварини, які одержували 5% водний розчин очищеного фреоно-аміачного екстракту суцвіть липи (об'єкт С) в дозі 30 мг/кг, протизапальна активність якого становила 27%.

На другій годині дослідження спостерігали достовірне зниження набряку кінцівок щурів майже в усіх групах: об'єкт А зменшував набряк в 1,5 та 2,1 раза в дозах 10 і 30 мг/кг відповідно, об'єкт В – в 1,9 та 1,7 раза в аналогічних дозах, субстанція С – в 1,3 рази (30 мг/кг). Під дією референт-препарату набряк зменшувався в 1,8 раза. За протизапальною активністю на другій годині експерименту досліджувані речовини можна розподілити у наступний ряд: А (30 мг/кг) – 53% > В (10 мг/кг) – 47% > референт-препарат – 43% > В (30 мг/кг) – 41% > А (10 мг/кг) – 33% > С (30 мг/кг) – 25,5%.

Третя година експерименту також характеризувалася достовірним зменшенням набряку лап щурів порівняно з контрольною патологією. Так, у тварин, яким вводили субстанцію А в дозах 10 і 30 мг/кг, набряк зменшувався в 1,7 та 2,1 раза відповідно; препарат В за аналогічних умов спричинював зменшення набряку у 1,8 й 1,7 раза відповідно. Найбільша протизапальна активність на третій годині експерименту була виявлена у разі застосування об'єкту А (30 мг/кг) і становила 53%; далі зразки речовин можна розподілити у наступній послідовності: референт-препарат – 47% > В (10 мг/кг) – 44% > А (10 мг/кг) – 42% > В (30 мг/кг) – 40% > С (30 мг/кг) – 13,4%.

Достовірні ефекти у дослідних групах порівняно з контрольною спостерігали також і на четвертій годині експерименту: в 1,2 і 1,8 раза зменшилися набряки задніх кінцівок у тварин, яким вводили субстанцію А в дозах 10 та 30 мг/кг відповідно; в 1,4 та 1,3 раза – під впливом зразку В в аналогічних дозах, в 1,5 раза – в результаті дії референт-препарату. Розчин очищеного фреоно-аміачного екстракту на дану фазу запалення практично не впливав. Протизапальна активність на четвертій годині експерименту була найбільш вираженою у групі тварин, яким вводили об'єкт А в дозі 30 мг/кг, і становила 45%.

Т а б л и ц я 1

Вивчення антиексудативної активності препаратів з екстрактами
липи серцелистої на моделі карагенінового набряку у щурів (n=5)

| Умови досліджу (n=5) | | Динаміка розвитку запалення | | | | | |
|---|-------------------------------|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 1 год | 2 год | 3 год | 4 год | 5 год | 6 год |
| Контрольна патологія | ΔV_{κ} , ум. од. | 15,6 ± 1,4 | 36,8 ± 2,2 | 44,8 ± 2,4 | 36,4 ± 1,4 | 32,4 ± 1,3 | 28,4 ± 1,9 |
| Тварини, яким вводили об'єкт А (10 мг/кг) | ΔV_{ρ} , ум. од. | 18,2 ± 1,7 | 24,8 ± 2,1* | 26,1 ± 3,2* | 29,4 ± 1,6* | 29,2 ± 1,2 | 25,4 ± 1,2 |
| | ПЗА, % | - | 33% | 42% | 19% | 10% | 11% |
| | | Середня ПЗА 23% | | | | | |
| Тварини, яким вводили об'єкт А (30 мг/кг) | ΔV_{ρ} , ум. од. | 15,5 ± 1,2 | 17,3 ± 1,5* | 21,0 ± 3,1* | 20,0 ± 1,2* | 23,5 ± 1,4* | 20,8 ± 2,5* |
| | ПЗА, % | 0,6% | 53% | 53% | 45% | 27% | 27% |
| | | Середня ПЗА 41% | | | | | |
| Тварини, яким вводили об'єкт В (10 мг/кг) | ΔV_{ρ} , ум. од. | 13,4 ± 1,1 | 19,4 ± 1,7* | 25,0 ± 2,1* | 25,6 ± 1,5* | 31,2 ± 1,3 | 27,2 ± 2,4 |
| | ПЗА, % | 14% | 47% | 44% | 30% | 4% | 4% |
| | | Середня ПЗА 24% | | | | | |
| Тварини, яким вводили об'єкт В (30 мг/кг) | ΔV_{ρ} , ум. од. | 15,2 ± 1,3 | 21,6 ± 2,1* | 26,8 ± 1,9* | 28,4 ± 1,7* | 33,2 ± 1,4 | 28,8 ± 1,4 |
| | ПЗА, % | 2,6% | 41% | 40% | 22% | - | - |
| | | Середня ПЗА 27% | | | | | |
| Тварини, яким вводили об'єкт С (10 мг/кг) | ΔV_{ρ} , ум. од. | 17,2 ± 1,2 | 41,6 ± 2,9 | 52,6 ± 2,6 | 44,6 ± 3,5 | 41,8 ± 4,1 | 33,6 ± 1,3 |
| | ПЗА, % | - | - | - | - | - | - |
| Тварини, яким вводили об'єкт С (30 мг/кг) | ΔV_{ρ} , ум. од. | 11,4 ± 1,3* | 27,4 ± 2,5* | 38,8 ± 1,5 | 38,4 ± 3,1 | 34,2 ± 2,7 | 28,8 ± 1,7 |
| | ПЗА, % | 26,9% | 25,5% | 13,4% | - | - | - |
| | | Середня ПЗА 22% | | | | | |
| Тварини, яким вводили референс-препарат (8 мг/кг) | ΔV_{ρ} , ум. од. | 13,25 ± 1,5 | 21,0 ± 2,3* | 23,8 ± 1,6* | 24,0 ± 1,2* | 27,5 ± 2,2 | 28,0 ± 1,4 |
| | ПЗА, % | 15% | 43% | 47% | 34% | 15% | 1,4% |
| | | Середня ПЗА 26% | | | | | |

П р и м і т к и: ПЗА – протизапальна активність; * – відхилення статистично значуще відносно тварин групи контрольної патології.

На п'ятій та шостій годинах експерименту достовірно зменшення набряку лапи щурів в 1,4 раза спостерігали тільки в групі тварин, які отримували об'єкт А (30 мг/кг), найбільшу протизапальну активність (27%) також спостерігали в цій групі. В інших групах тварин на даній фазі запалення не було виявлено достовірної різниці відносно контрольної патології.

Було також встановлено, що препарат С в дозі 10 мг/кг не спричинював протизапального ефекту протягом усього експерименту.

За відсотком середньої протизапальної активності досліджувані речовини можна розподілити в наступний ряд: А (30 мг/кг) – 41% > В (30 мг/кг) – 27% > референс-препарат (8 мг/кг) – 26% > В (10 мг/кг) – 24% > А (10 мг/кг) – 23% > С (30 мг/кг) – 22%. Враховуючи, що зразок В мав розведення 1:50, можна вважати дифторметановий екстракт, одержаний зі шроту суцвіть липи після попереднього їх оброблення зрідженим фреоном-22, найактивнішим серед досліджуваних об'єктів. Окрім того, в дозі 10 мг/кг субстанція В виявляла приблизно таку саму активність, як і за дозування 30 мг/кг, а на деяких фазах запалення навіть більш високу. Ефективність зразку А, навпаки, чітко зростала зі збільшенням дози з 10 до 30 мг/кг. Дія об'єкту С спостерігалась лише за дози 30 мг/кг, причому лише на ранніх стадіях запалення.

Аналізуючи динаміку експериментальної патології, можна зробити висновок, що екстракти суцвіть липи, одержані різними зрідженими газами, мають достатню селективність проти певних медіаторів запалення. Так, обидва фреонових екстракти діють переважно на кінінову систему, а дифторхлорметановий у разі збільшення дози – ще й на простагландини. Очищений фреоно-аміачний екстракт, який є найбільш гідрофільним, в дозі 30 мг/кг вибірково інгібує медіатори ранньої фази запалення – гістамін і серотонін. Отже, комбінації вищезазначених зразків можуть виявлять потенційований синергізм та діяти на запалення різної природи комплексно.

В и с н о в к и

1. Проведено скринінгові фармакологічні дослідження зразків, що містять зрідженогазові екстракти суцвіть липи.

2. В результаті експериментів встановлено, що досліджувані субстанції (за винятком розчину очищеного фреоно-аміачного екстракту, введеного в дозі 10 мг/кг) виявляли виражену антиексудативну активність.

3. Показано, що максимально ефективними були зразки з дифторметановим і дифторхлорметановим екстрактами в дозах 10 та 30 мг/кг відповідно.

4. Встановлено, що зрідженогазові екстракти суцвіть липи мають достатню селективність проти певних медіаторів на різних стадіях запалення. Комбінації вищезазначених субстанцій є перспективними для створення препаратів із комплексною синергічною дією.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Журенко Д. С., Цубанова Н. А.* Дослідження протизапальної активності супозиторіїв із рослинними екстрактами // Актуальні питання створення нових лікарських засобів: Матер. Всеукр. наук.-практ. конф. студ. та мол. вчених, 21 квітня 2011 р. – Харків: НФаУ, 2011. – С. 284.

2. *Захаревский А. С.* Влияние некоторых производных индола на нервную систему: Автореф. дис. ... канд. мед наук. – Минск, 1969. – 20 с.

3. *Aguirre-Hernandez E.* Bioactivity-guided isolation of β -sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *tilia americana* var. *mexicana* // *Planta Medica*. – 2007. – V. 73, N 11. – P. 1148–1155.

4. *Ahn D. K.* Illustrated book of Korean medicinal herbs. – Seoul: Kyohak Publishing Co. Ltd., 2003. – 56 p.

5. *Ajay M., Anwar-ul H.G., Mustafa M.R.* Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta // *Life Sci*. – 2003. – V. 74. – P. 603–612.

6. *Coleta M., Campos M.G., Cotrim M.D., Proença da Cunha A.* Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. and *Hypericum perforatum* L. in the elevated plus maze anxiety test // *Pharmacopsychiatry*. – 2001. – V. 34, N 1. – P. 20–21.
7. *Di Rosa M., Sorrentino L.* The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin // *Eur. J. Pharmacol.* – 1968. – V. 4. – P. 340–343.
8. *Cotrim M. D., Figueiredo I. V., Cavadas C. et al.* Effects of *Tilia europaea* on guinea pig ileum and aorta // *Br. J. Pharmacol.* – 1995. – V. 114 (Suppl.). – P. 287.
9. *Perez-Vizcaino F., Ibara M., Angel L. et al.* Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2002. – V. 302. – P. 66–72.
10. *Viola H., Wolfman C., Destein M. L. et al.* Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliceae) // *J. Ethnopharmacol.* – 1994. – V. 44. – P. 47–53.
11. *Lanza J. P., Steinmetz M.* Action comparees des extrait aqueux de graines de *Tilia platyphylla* et de *Tilia vulgaris* sur l'intestine isole de rat // *Fitoterapia*. – 1986. – V. 57. – P. 185–188.
12. *Aguirre-Hernández E., Martínez A.L., González-Trujano M.E. et al.* Pharmacological evaluation of the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* L. var. *mexicana* in mice // *J. Ethnopharmacol.* – 2007. – V. 109, N 1. – P. 140–145.
13. *Pérez-Ortega G., Guevara-Fefer P., Chávez M. et al.* Sedative and anxiolytic efficacy of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences used traditionally by communities of State of Michoacan, Mexico // *J. Ethnopharmacol.* – 2008. – V. 116, N 3. – P.461–468.
14. *Al-Essa M.K., Mohammed F.I., Shafagoj Y.A., Afifi F.U.* Studies on the direct effects of the alcohol extract of *tilia cordata* on dispersed intestinal smooth muscle cells of guinea pig // *Pharm. Biol.* – 2007. – V. 45, N 3. – P. 246–250.
15. *Barreiro Arcos M.L., Cremaschi G., Werner S. et al.* *Tilia cordata* Mill. Extracts and scopoletin (isolated compound): differential cell growth effects on lymphocytes // *Phytother. Res.* – 2006. – V. 20, N 1. – P. 34–40.

Надійшла до редакції 25.04.2012.

*С. М. Дрогозов, Г. В. Белик, Д. В. Демьяненко, О. В. Кудина,
Мохаммад Реза Дадашкарими*

СКРИНИНГОВЫЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СЖИЖЕННОГАЗОВЫХ ЭКСТРАКТОВ СОЦВЕТЕЙ ЛИПЫ

Ключевые слова: противовоспалительная активность, фармакологический скрининг, экстракты, соцветия липы, сжиженные газы

РЕЗЮМЕ

Проведены скрининговые фармакологические исследования образцов, содержащих сжиженногазовые экстракты соцветий липы. Установлено, что препараты с фреоновыми экстрактами проявляли выраженную антиэкссудативную активность в дозах 10 и 30 мг/кг. Показано, что сжиженногазовые экстракты соцветий липы характеризуются достаточной селективностью против определенных медиаторов на разных стадиях воспаления.

*S. M. Drogovoz, G. V. Belik, D. V. Demyanenko, O. V. Kudina,
Mohammad Reza Dadashkarimi*

SCREENING PHARMACOLOGICAL STUDY OF CONDENSED GAS EXTRACTS FROM LIME FLOWERS

Keywords: anti-inflammatory activity, pharmacological screening, extracts, lime flowers, condensed gases

S U M M A R Y

Screening pharmacological studies of samples containing condensed gas extracts from lime flowers have been carried out. It was found that drugs with freon extracts showed marked anti-exudative activity at doses of 10 and 30 mg/kg. It was shown that condensed gas extracts obtained from lime flowers are characterized by sufficient selectivity against certain mediators at different stages of inflammation.