

Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

ФЕЩЕНКО ГАЛИНА ІГОРІВНА

УДК 615.243.038:615.322:582.776.6

**ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ ЕКСТРАКТУ
ХАМЕРІЮ ВУЗЬКОЛИСТОГО ЯК ПРОТИВИРАЗКОВОГО ЗАСОБУ**

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
ОЛЕЩУК ОЛЕКСАНДРА МИХАЙЛІВНА,
Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України,
завідувач кафедри фармакології з клінічною фармакологією

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, професор
ЯКОВЛЄВА ЛАРИСА ВАСИЛІВНА,
Національний фармацевтичний університет (м. Харків),
професор кафедри фармацевтичного маркетингу та менеджменту

доктор медичних наук, професор
ШЕРЕМЕТА ЛІДІЯ МИКОЛАЇВНА,
Івано-Франківський національний медичний університет,
професор кафедри фармакології і внутрішньої медицини № 3 імені професора М. М. Бережницького

Захист відбудеться "9" жовтня 2020 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий "8" вересня 2020 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
д. фарм. наук, професор

К. Г. Щокіна

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Виразкова хвороба (ВХ) шлунка та дванадцятипалої кишки є найпоширенішою серед патологій шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Більше 10 % населення світу страждають на ВХ, і, в основному, це люди віком від 18 до 40 років, а також спостерігається тенденція до збільшення чисельності хворих серед підлітків і дітей (Jincy J. et al., 2019; Кізлова Н. М. і співавт.; 2018; Хіміон Л. В. і співавт., 2018). Для України характерною є висока захворюваність та частота рецидивування (20-25 %), порівняно із європейськими країнами. Хронічний характер даної патології та розвиток деструктивних процесів спричиняє тривалу втрату працездатності хворими та їх інвалідизацію (Волкова В. А., 2015; Москаленко В. Ф., 2013; Чепелевська Л. А., Яценко Ю. Б., 2013).

Збільшення кількості хворих на ВХ та зростаючі вимоги до оцінки ефективності та результативності фармакотерапії спонукають до пошуку та створення нових високоефективних і безпечних противиразкових лікарських засобів (ЛЗ). На сьогодні терапія ВХ включає схеми одночасного використання антибактеріальних, антисекреторних, репаративних препаратів, більшість з яких є синтетичними зі значною кількістю побічних ефектів і рядом протипоказань (Зальгіна Е. В., Подплетня Е. А., 2017). Тому патогенетично виправданим є застосування у комплексній терапії ВХ засобів рослинного походження, оскільки ці препарати характеризуються широким спектром фармакологічних властивостей та високою безпечністю при достатній ефективності (Kuna L. et al., 2019; Куркин В. А., 2006). Рослинні засоби можна застосовувати впродовж тривалого часу як з метою профілактики виникнення рецидивів, так і в комплексному лікуванні ВХ при її загостренні.

Враховуючи вищезазначене, доцільним є пошук альтернативних засобів рослинного походження для комплексного лікування ВХ. Інтерес представляє відома лікарська рослина – хамерій вузьколистий (*Chamerion angustifolium* L.), який має в Україні достатню сировинну базу та містить значну кількість біологічно активних речовин (БАР), і, згідно з даними літератури, з давніх-давен використовується у народній медицині при запальних захворюваннях дихальних шляхів, ВХ шлунка та дванадцятипалої кишки, онкологічних захворюваннях стравоходу, шлунка, кишечника, при нейродермітах, екземі, фурункульозі (Товстуха Є. С., 2010).

Тому дослідження гастропротекторної дії ліофілізованого екстракту хамерію вузьколистого (ЛЕТХ), одержаного і стандартизованого на кафедрі фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського, з метою створення нового вітчизняного противиразкового засобу, є актуальним.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами. Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних програм кафедри фармакології з клінічною фармакологією Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Фармакологічні та фармакогенетичні аспекти протекторного впливу імунобіологічних препаратів, ентеросорбентів, речовин природнього та синтетичного походження за різних патологічних станів (номер Державної реєстрації 0116U004148) та «Фармакологічне

дослідження кардіо- та гастропротекторного впливу біотехнологічних, рослинних та синтетичних лікарських засобів» (номер Державної реєстрації 0119U000617).

Мета та завдання дослідження. Метою роботи було експериментальне обґрунтування можливостей застосування ЛЕТХ для профілактики та в комплексній терапії ВХ шлунка.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

1. Здійснити фітохімічні дослідження трави та ЛЕТХ, ідентифікувати основні БАР та провести стандартизацію ЛЕТХ.
2. Вивчити гостру токсичність та деякі показники безпеки (можливу ульцерогенну дію) ЛЕТХ.
3. Провести вивчення противиразкової активності ЛЕТХ на моделі аспіринової (ацетилсаліцилової) виразки шлунка у щурів та визначити умовно-ефективну дозу.
4. Вивчити противиразкову активність ЛЕТХ на моделі етанол-преднізолонового ураження слизової оболонки шлунка (СОШ) у щурів.
5. Здійснити гістологічне вивчення тканин СОШ тварин з експериментальною аспіриною та етанол-преднізолоною виразкою шлунка у щурів.
6. Дослідити мембраностабілізуючу та антиоксидантну дію ЛЕТХ як основних компонентів механізму противиразкової дії на моделях гемолізу, ORAC і тетрахлорметанового гепатиту у щурів.
7. Дослідити спектр інших видів фармакологічної активності ЛЕТХ: протизапальної, антиальтеративної та антипроліферативної, анальгетичної, кровоспинної, антимікробної.

Об'єкт дослідження: фармакокорекція виразкових уражень шлунка.

Предмет дослідження: якісний склад та кількісний вміст основних БАР ЛЕТХ; його противиразкова дія та супутні фармакологічні властивості.

Методи дослідження. При виконанні дисертаційної роботи використовували комплексний підхід із залученням фітохімічних (методи хроматографії, спектрофотометрії, титриметрії), фармакологічних (моделі аспіринової та етанол-преднізолонової виразок; гострого тетрахлорметанового гепатиту; карагенінового та зимозанового набряків; асептичного запалення шкіри та підшкірної клітковини, викликаного введенням оцтової кислоти; ватної гранульоми; спонтанного гемолізу за методом Jager F. S., оцтово-кислих корчів), біохімічних (визначення вмісту ТБК-АП реактантів, відновленого глутатіону (ВГ), фібриногену, загального білка, загального холестеролу, загального білірубину; активності каталази (КТ), супероксиддисмутази (СОД), аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ)), токсикологічних (методів визначення гострої токсичності, місцевоподразнювальної дії), гістологічних (світлової мікроскопії), мікробіологічних (протимікробні властивості ЛЕТХ вивчено в умовах *in vitro* відповідно до методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів», затверджених наказом МОЗ України № 167 від 05.04.2007 р., метод серійних розведень у рідкому живильному середовищі та метод дифузії в агар у модифікації «колодязів»), дослідження цито- та генотоксичності методами *in vitro* (МТТ-аналіз, аналіз Comet, аналіз мітохондріального потенціалу клітин, аналіз фрагментації ДНК), методів математичної статистики.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше експериментально встановлено якісний склад і визначено кількісний вміст основних БАР ЛЕТХ та вивчено його фармакологічну активність; теоретично-експериментально обґрунтовано зв'язок між БАР досліджуваного екстракту та його фармакологічною активністю.

Експериментально обґрунтовано можливість застосування ЛЕТХ для профілактики та комплексного лікування ВХ різного генезу.

На моделі аспіринового ураження СОШ визначено умовно-ефективну дозу ЛЕТХ за противиразковою дією, яка становить 20 мг/кг маси тіла тварини.

Встановлено, що відповідно до класифікації токсичності речовин, ЛЕТХ при внутрішньошлунковому введенні належить до IV класу токсичності – малотоксичні речовини ($LD_{50} \geq 5000$ мг/кг). При вивченні цито- та генотоксичності екстракту *in vitro* встановлено, що причиною загибелі клітин при дослідженні був апоптоз.

Вперше встановлено наявність противиразкової активності ЛЕТХ на аспіриновій та етанол-преднізолоновій моделях ураження СОШ. Противиразкова активність ЛЕТХ у дозі 20 мг/кг на моделі аспіринового ураження СОШ склала 69 % (виразність пошкодження СОШ знижувалася в середньому в 3,2 разу відносно КП); на моделі етанол-преднізолонового – 49 % (виразність пошкодження СОШ знижувалася в середньому в 4,3 разу); препарат порівняння збір «Гастрофіт» виявив противиразкову активність на рівні 61 % і 49 % відповідно.

Розширено уявлення про механізми гастропротекторної активності ЛЕТХ, складовою якої є антиоксидантна і мембраностабілізуюча дія. Досліджуваний екстракт нормалізував прооксидантно-антиоксидантний баланс, про що свідчило зменшення у 1,5 рази вмісту ТБК-реактивних у гомогенаті печінки дослідних щурів, зростання в 1,5 рази рівня ВГ, збільшення відповідно на 31,8 % та 34,5 % активності СОД і каталази порівняно з тваринами КП. ЛЕТХ гальмував цитолітичні процеси, знижуючи активність АЛТ у 1,9 разу та АсАт у 1,3 разу відносно групи КП.

Доведено, що ЛЕТХ у дозі 20 мг/кг виявляє протизапальну активність (на моделі карагенінового набряку стопи у щурів вона склала 32 %, на моделі зимозанового набряку – 44 %), анальгетичну активність – 79 %, мембраностабілізуючу активність – 28 %. ЛЕТХ чинить кровоспинну дію, зменшуючи час згортання крові щурів на 29 %.

Встановлена антибактеріальна активність ЛЕТХ. Доведено його бактерицидний ефект на грампозитивну мікрофлору, фунгістатичний – до грибів роду *Candida*. Затримка росту тест-культур була найбільш вираженою при використанні 50 % розчину ЛЕТХ щодо *Staphylococcus aureus* ($d=20 \pm 2,3$) мм та *Bacillus cereus* ($d=25 \pm 2,2$) мм.

Експериментально доведено, що ЛЕТХ у дозі 20 мг/кг не впливає на стан СОШ, не виявляє ульцерогенної дії та не має місцевоподразнювальних властивостей.

Наукова новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель за № 122804, 2018 р. «Спосіб одержання фармакологічно активної субстанції з протизапальною та антимікробною дією».

Практичне значення отриманих результатів. Робота є експериментальним дослідженням, у якому доведена противиразкова активність ЛЕТХ. Одержані результати обґрунтовують доцільність подальшого вивчення ЛЕТХ з метою

створення вітчизняного фітопрепарату для профілактики і комплексного лікування ВХ.

Результати дисертаційної роботи впроваджено в науково-дослідну та науково-педагогічну роботу кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова (протокол № 8 від 5.02.2019 р.), кафедри фармакології Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця (м. Київ) (протокол № 23 від 20.05.2019 р.), кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету (м. Харків) (протокол № 18 від 8.01.2019 р.), кафедри фармакології Івано-Франківського національного медичного університету (протокол № 6 від 11.01.2019 р.), кафедри клінічної фармації ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» (протокол № 1 від 29.01.2019 р.), кафедри фармакогнозії, фармакології і ботаніки Запорізького державного медичного університету (протокол № 2 від 10.01.2019 р.).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Автором особисто здійснено патентно-інформаційний пошук, проведено аналіз даних літератури за темою дисертації, особисто виконані експериментальні дослідження, проведена статистична обробка й аналіз одержаних результатів, оформлення їх у вигляді таблиць, графіків і діаграм, сформульовані висновки дисертації.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертантом наведено результати власних експериментальних досліджень, взято участь в аналізі та узагальненні одержаних даних, у написанні статей.

Співавторами наукових праць є науковий керівник О. М. Олещук та науковці, спільно з якими проведено деякі дослідження – С. М. Марчишин, Н. І. Ткачук, Г. Р. Козир, О. Ю. Кошова, С. С. Наконечна, БМ. С. Фещенко, М. І. Луканюк, Н. В. Красуля, М. І. Куліцька, О. Б. Калушка, С. Л. Маланчук. Постановка мети та завдань, обговорення результатів проведено разом із науковим керівником.

Гістологічні дослідження проведено на базі Національного фармацевтичного університету МОЗ України (м. Харків) за консультативної допомоги к. біол. наук, ст. наукового співробітника ЦНДЛ Ю. Б. Лар'яновської. Мікробіологічні дослідження проведено на базі лабораторії мікробіологічних та паразитологічних досліджень ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України» за участю та під керівництвом к. мед. наук, доцента Н. І. Ткачук.

Дослідження цито- та генотоксичності здійснено на базі кафедри фармацевтичних наук Університету м. Перуджа (Італія) під керівництвом проф. Tommaso Vessari.

Апробація матеріалів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були викладені і обговорені на 43й Всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (м. Харків, 19-20 квітня 2012 р.); 2 International conference and workshop “Plant – the source of research material” (Lublin, 18-20 October, 2012); I Міжнародній науково-практичній internet-конференції «Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин» (м. Харків, 20-21 березня 2014 р.); XVIII, XX і XXII Міжнародних медичних конгресах студентів та молодих вчених (м. Тернопіль, 28-30 квітня 2014 р.; 25-27 квітня 2016 р., 23-25 квітня 2018 р.); II Всеукраїнській науково-

практичній конференції молодих вчених «Лікарські рослини: традиції та перспективи досліджень» (м. Березоточа, 4-5 червня 2014 р.); IV Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Хімія природних сполук» (м. Тернопіль, 21-22 квітня 2016 р.); VIII Національному з'їзді фармацевтів України «Фармація XXI століття: тенденції та перспективи» (м. Харків, 13-16 вересня, 2016 р.); VI науково-практичній конференції з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (м. Тернопіль, 10-11 листопада 2016 р.); V Національному з'їзді фармакологів України (м. Запоріжжя, 18-20 жовтня 2017 р.); II Міжнародній науково-практичній конференції «Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів» (м. Харків, 28-29 березня 2018 р.); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання фармакології та фармакотерапії» (м. Тернопіль, 26-27 вересня 2019 р.); науково-практичній internet-конференції «Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації» (м. Харків, 22-23 жовтня 2019 р.).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 23 наукових роботи: 8 статей у фахових виданнях, у тому числі 3 статті у профільних зарубіжних журналах, які входять до міжнародних наукометричних баз, 14 тез доповідей. Одержано 1 патент України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 248 сторінках машинописного тексту, складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, розділу «Аналіз та узагальнення результатів», висновків, списку використаних джерел та 3 додатків. Обсяг основного тексту дисертації складає 168 сторінок друкованого тексту. Робота ілюстрована 30 таблицями та 46 рисунками. Список використаних джерел містить 393 найменувань, з них 271 кирилицею та 122 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Матеріалом для досліджень була трава та ліофілізований екстракт з трави хамерію вузьколистого (ЛЕТХ), одержаний і стандартизований на кафедрі фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України (Марчишин С. М. і співавт., 2018). Трава хамерію вузьколистого заготовлена на території Тернопільської області.

Фітохімічні дослідження. З метою визначення доброякісності лікарської рослинної сировини визначали її числові показники: втрату в масі при висушуванні, загальну золу та золу, нерозчинну в хлористоводневій кислоті (ДФУ. 2.0).

Кількісний вміст органічних кислот визначали методом титриметрії, аскорбінової кислоти, суми гідроксикоричних кислот, суми флавоноїдів та поліфенолів – спектрофотометричним методом (ДФУ 2.0; С. М. Марчишин та співавт., 2017), кислот жирних та органічних – методом ГХ/МС (М. М. Кучер, І. Й. Галькевич, 2011), ідентифікацію сполук фенольної природи – методом ВЕРХ на хроматографі Agilent 1200 3 D LC System Technologies (США) (С. М. Марчишин, С. С. Козачок, 2013); макро- та мікроелементів – атомно-абсорб-

ційної спектрофотометрії (А. И. Ермаков и соавт., 1987), вуглеводів – гравіметричним методом, якісний склад моноцукрів і сахарози – ГХ/МС (L. Husak et al., 2018; I. Chen et al., 2009; E. A. Gunter, 2001). Дослідження якісного складу та кількісного вмісту амінокислот у досліджуваному об'єкті здійснювали за допомогою ВЕРХ аналізу на хроматографі фірми Agilent Technologies (модель 1100) (A. Jámboř, I. Molnár-Perl, 2009).

Фармакологічні дослідження виконано відповідно до рекомендацій ДЕЦ МОЗ України «Доклінічні дослідження лікарських засобів» (за редакцією О. В. Стефанов, 2001) на 38 щурах (5 самок, 33 самці) масою 160-180 г з віварію ТНМУ імені І. Я. Горбачевського (посвідчення № 053/13 від 04.03.2013 р.; чинне до 03.03.2018 р.); 41 мишах (9 самок, 32 самці) масою 15-20 г, 234 щурах-самцях масою 150-180 г та 10 кролях-самцях, вирощених у розпліднику віварію Національного фармацевтичного університету (посвідчення № 058/15 від 08.12.2015 р.; чинне до 07.12.2019 р.).

У фармакологічних експериментах ЛЕТХ вводили внутрішньошлунково (в/ш) у вигляді водного розчину.

Гостру токсичність (LD_{50}) ЛЕТХ вивчали за методом В. Б. Прозоровського (В. Б. Прозоровский, 1992). Критеріями оцінки гострої токсичності була клінічна картина інтоксикації: загибель тварин, їх загальний стан, зміни маси тіла. Клас токсичності визначали за класифікацією К. К. Сидорова за ступенем летальності (К. К. Сидоров, 1973).

Визначення найефективнішої дози за гастропротекторною активністю ЛЕТХ проводили на моделі субхронічного ерозивно-геморагічного ураження СОШ, що було викликане ацетилсаліциловою кислотою (АСК) (Ацетилсаліцилова кислота, табл., 500 мг № 10; ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна). Вводили ЛЕТХ в дозах 5, 10 та 20 мг/кг. Умовно-ефективна доза склала 20 мг/кг і була використана в подальших дослідженнях.

Етанол-преднізолонову гостру виразку шлунка моделювали внутрішньошлунковим (в/ш) введенням суміші преднізолону в дозі 20 мг/кг та 80 % етанолу в дозі 6 мл/кг (Д. В. Семенів, 2014; О. В. Стефанов, 2001).

У дослідях з вивчення противиразкової активності на аспіриновій та етанол-преднізолоновій моделях як препарат порівняння використовували відвар збору «Гастрофіт» у дозі 3,8 мл/кг («Гастрофіт», 1,5 г у фільтр-пакеті № 20; ТОВ «Науково-виробнича фармацевтична компанія «ЕЙМ») Дозу препарату порівняння розраховували виходячи з добової дози для людини з урахуванням площі та маси тіла тварин (Уланова И. П. и соавт., 1968).

Антиоксидантні властивості ЛЕТХ визначали методом ORAC, який базується на швидкості розпаду флуоресценції (ORACFL) в присутності вільних радикалів (ROO-) у порівнянні зі стандартом. Екстрагували гідрофільні та ліпофільні фракції відповідно до Prior R. L. et al. (Prior R. L. et al., 2003). Аналіз ORACFL проводили на флуоресцентному зчитувачі FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Оффенбург, Німеччина) за довжини хвилі збудження 485 нм і довжини хвилі 520 нм (Ceccarini M. R. et al., 2016).

Вивчення мембраностабілізуючих та антиоксидантних властивостей ЛЕТХ проводили на моделі гострого токсичного ураження печінки тетраклорметаном

(Загайко А. Л. і співавт., 2017; Дроговоз С. М. і співавт. 2001). Гострий токсичний гепатит викликали введенням 50 % олійного розчину тетрахлорметану щурам в/ш в дозі 0,7 мл/100 г маси тіла одноразово. Препаратом порівняння було обрано еталонний гепатопротектор рослинного походження під торгівельною назвою «Силібінін», який містить екстракт плодів розторопші плямистої («Силібінін», табл., 100 мг № 10, ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», м. Харків, Україна). Ступінь інтенсивності ПОЛ оцінювали за вмістом у гомогенаті печінки продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-реактивів) (И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили, 1977); стан системи антиоксидантного захисту оцінювали за активністю СОД (Костюк В. А. і співавт., 1990); КТ (Королюк М. М. и соавт., 1988), ВГ (Verbunt R. J. et al., 1995); показник білкового обміну – вміст загального білка мікробіуретовим методом з реактивом Бенедикта (Г. А. Кочетов, 1980; активність маркерних ферментів цитолізу – АЛАТ і АсАТ, холестазу – ЛФ – за допомогою стандартних наборів фірми «Філісіт-Діагностика, Україна»; розраховували коефіцієнт Де-Рітіса (співвідношення АсАТ/АЛАТ); вміст загального холестеролу, загального білірубину визначали за допомогою стандартних наборів фірми «Філісіт-Діагностика, Україна». Для оцінки стану енергозабезпечення клітин шлунка у СОШ визначали вміст СДГ (В. С. Камышников, 2003).

У плазмі крові визначали показники згортальної системи крові щурів: вміст фібриногену, протромбіновий час та активований частковий тромбoplastиновий час (АЧТЧ) на коагулометричному аналізаторі RT-2204С (Італія) за допомогою наборів фірми «НПО РЕНАМ» (Росія).

Дослідження морфологічної структури СОШ та печінки проводили за допомогою стандартних методів світлової мікроскопії (Горальський Л. П. і співавт., 2011; Э. Пирс, 1962).

Мембраностабілізуючу активність також вивчали за впливом ЛЕТХ на спонтанний гемоліз за методом Jager F. S. (Вороніна Л. М. і співавт., 1996). Як препарат порівняння використовували синтетичний препарат природного антиоксиданту, олійний оральний розчин токоферол ацетату у дозі 50 мг/кг (α -токоферолу ацетат (вітамін Е), 50 мг/мл, ПрАТ «Технолог», Україна) (Rahimi R. et al., 2005).

При вивченні протизапальної дії на моделях *in vivo* гостре асептичне запалення відтворювали введенням 0,1 мл 1 % розчину карагеніну (І серія) та 0,1 мл 2 % розчину зимозану (ІІ серія) субплантарно у праву задню стопу (О. В. Стефанов, 2001). Як препарат порівняння у І серії дослідів використовували натрію диклофенак (табл., 50 мг, «Ортофен» виробництва ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», м. Харків, Україна, серія 571112) у дозі 8 мг/кг; у ІІ серії – кверцетин (гранули, 2 г в пакетику, «Кверцетин» виробництва Борщагівського ХФЗ, м. Київ, Україна) у дозі 50 мг/кг. ЛЕТХ вводили в/ш в дозах 5, 10 та 20 мг/кг. За розвитком набряку спостерігали в динаміці: через 1, 2, 3, 4 та 5 год за умов карагенінового набряку і через 1, 2 та 3 год – при зимозановому набряку (О. В. Стефанов, 2001).

Анальгетичну активність досліджуваного об'єкту вивчали на моделі оцтовокислих корчів у мишей (Довженок І. А., Самура Б. А., 2013; Кукушкин М. Л., Хитров Н. К., 2004). ЛЕТХ вводили тваринам в/ш одноразово у дозах 10 і 20 мг/кг. Як препарат порівняння використовували таблетки натрію метамізол у дозі

50 мг/кг (Анальгін-здоров'я, табл. метамізолу натрію моногідрату 500 мг № 10, ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», м. Харків, Україна).

Антимікробну активність ЛЕТХ вивчали диско-дифузійним методом та методом серійних розведень на базі лабораторії мікробіології та паразитології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України (Климнюк С. І. і співавт., 2009). Як тест-культури були вибрані музейні штами *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* NCTC 74, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida spp.* ATCC 885-653.

Отримані *in vivo* експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою стандартного пакету статистичних програм «Statistica v. 6,0». Для отримання статистичних висновків при порівнянні виборок відносних перемінних застосовували однофакторний дисперсійний аналіз та критерій Манна-Уїтні; параметричний критерій Ньюмена-Кейлса; непараметричний критерій Крускала-Уолліса. Відмінності між контрольними та дослідними групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$ (О. Ю. Реброва, 2006; Лапач С. Н. і соавт., 2001). У дослідженнях *in vitro* результати були виражені у вигляді середніх значень і стандартного відхилення (SD). Всі аналізи проводили тричі. Статистичний аналіз проводили з використанням статистичного програмного забезпечення SPSS (SPSS Inc., Чикаго, Іл, США). Статистичні відмінності оцінювали за допомогою одностороннього аналізу дисперсії (ANOVA) з подальшим пост-спеціальним аналізом Данне з метою визначення відмінностей. Рівень значення для всіх статистичних аналізів встановлювали при $p < 0,05$ (А. А. Халафян, 2007).

Результати та їх обговорення. Результати фітохімічних досліджень показали, що ЛЕТХ містить різноманітні БАР – органічні, в тому числі аскорбінову, та амінокислоти, сполуки фенольної природи (флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, дубильні речовини), полісахариди, моноцукри, жирні кислоти, ефірну олію, а також макро- і мікроелементи.

Вміст аскорбінової кислоти у ЛЕТХ становив 0,27 %, суми органічних кислот – 5,77 %, суми флавоноїдів – 2,59 %, суми гідроксикоричних кислот – 3,75 %, поліфенолів – 20,63 %, водорозчинних полісахаридів – 18,16 % і пектинових речовин – 15,65 %, в яких визначено 13, ідентифіковано 5 цукрів – рибоза, арабіноза, маноза, глюкоза, галактоза. Встановлено наявність 16 вільних і 17 зв'язаних амінокислот, 11 жирних кислот, серед яких домінують лінолева (19,24 %) та ліноленова (39,28 %); 50 компонентів ефірної олії, з яких ідентифіковано – 32. Ідентифіковано та визначено кількісний вміст 5 макро- та 5 мікроелементів; виявлено значну кількість кальцію і фосфору, з мікроелементів – феруму.

Визначено та встановлено кількісний вміст індивідуальних сполук фенольної природи: складових дубильних речовин – фрагмент дубильних речовин, що гідролізуються (галова кислота), прості катехіни (епігалокатехін, катехін, епікатехін), складний катехін (епікатехін галат); флавоноїдів: рутин, ізокверцитрин, гіперозид, лютеолін, апігенін; гідроксикоричних кислот: хлорогенова, розмаринова, кофейна і *p*-кумарова кислоти та ізомер хлорогенової кислоти.

З трави хамерію вузьколистого одержано біологічно активну субстанцію – ЛЕТХ, що являє собою гігроскопічний порошок світло-коричневого кольору, зі специфічним, сильним запахом, гіркий на смак, помірно розчинний у воді. Його

було стандартизовано за вмістом фенольних сполук – флавоноїдів (12,5 %), гідроксикоричних кислот (9,5 %) і поліфенолів (24,0 %).

Встановлено, що за показником гострої токсичності за класифікацією К. К. Сидорова ЛЕТХ відноситься до IV класу токсичності – малотоксичні речовини, $LD_{50} \geq 5000$ мг/кг. При вивченні цитотоксичності ЛЕТХ *in vitro* методом МТТ було доведено погіршення росту і проліферації клітин при збільшенні концентрації. Результати дослідження методом Comet вказують на важливий і тяжкий генотоксичний ефект, індукований ЛЕТХ у концентраціях 50 і 75 мкг/мл. Результати, отримані при аналізі фрагментації ДНК, показали наростання залежності «доза-відповідь» і відсотку клітин з фрагментованою ДНК у всіх концентраціях та при обох варіантах часу експозиції екстракту. Ці результати подібні до результатів, які були виявлені в Comet аналізі, і вказують на те, що пошкодження ДНК може бути спричинене пізнім апоптозом.

ЛЕТХ не проявляв ульцерогенної та місцевоподразнювальної дії.

Дослідження гастропротекторної дії на моделі виразки шлунка у щурів, викликаній ацетилсаліциловою кислотою, встановлено, що введення ЛЕТХ у профілактично-лікувальному режимі стимулювало репаративні процеси в ділянках виразкового дефекту. Противираzkова активність ЛЕТХ у дозі 20 мг/кг на цій моделі склала 69 % і за ефективністю практично не поступалася препарату порівняння, настою збору «Гастрофіт» (61 %).

Обрано найефективнішу дозу ЛЕТХ – 20 мг/кг, у якій досліджуваний екстракт виявляв виразну гастропротекторну дію. Дозу 20 мг/кг обрано як умовно-терапевтичну для подальших експериментів.

Дослідження противираzkової активності ЛЕТХ на моделі ураження СОШ, викликаній ацетилсаліциловою кислотою, показало, що його профілактично-лікувальне введення сприяло статистично достовірному ($p < 0,05$) зниженню вмісту ТБК-АП у гомогенатах СОШ у 2,2 разу порівняно з КП, і даний показник не відрізнявся від параметру ІК ($26,15 \pm 5,1$ мкмоль/г і $26,67 \pm 3,47$ мкмоль/г відповідно). Також спостерігали підвищення вмісту ВГ у 1,4 разу у порівнянні з КП та нормалізацію СДГ – $1,51 \pm 0,09$ мкмоль/г і $1,45 \pm 0,09$ мкмоль/г у групі ІК (рис. 1). Одержані дані свідчать, що досліджуваний екстракт знижував інтенсивність процесів ПОЛ до фізіологічного рівня, нормалізував стан системи антиоксидантного захисту та поліпшував енергозабезпечення клітин СОШ.

За умов введення ЛЕТХ спостерігали нормалізацію показників згортальної ланки гемостазу. Найефективнішу дію ЛЕТХ виявив у дозі 20 мг/кг. За дії ЛЕТХ протромбіновий час та АЧТЧ статистично достовірно ($p < 0,05$) знижувалися в 1,5 рази і 1,4 разу відповідно у порівнянні з КП. Одночасно з покращенням показників коагуляційної ланки гемостазу відбувалося достовірне ($p < 0,05$) зниження концентрації фібриногену з 1,96 г/л (КП) до 1,39 г/л, що свідчило про зменшення виразності запалення у СОШ щурів. Це підтверджувалося й макроскопічним аналізом стану СОШ (виразність запалення зменшувалася до одного балу).

Противираzkова активність ЛЕТХ на етанол-преднізолоновій моделі склала 49 %, як і препарату порівняння настою збору «Гастрофіт».

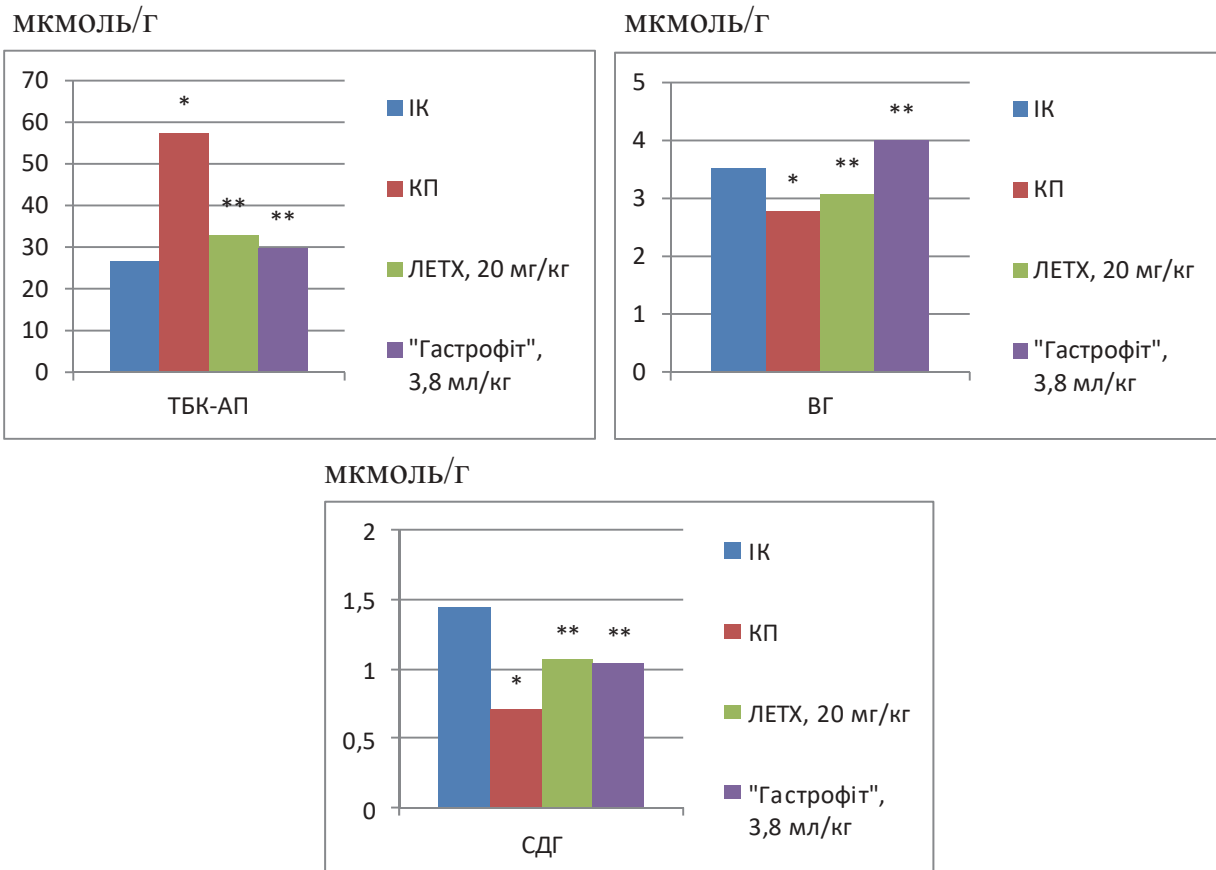


Рис. 1 Вплив ЛЕТХ на біохімічні показники гомогенату СОШ у щурів на моделі ураження СОШ, викликаній ацетилсаліциловою кислотою

Примітки:

1. * – відмінності статистично достовірні щодо значень інтактного контролю, $p < 0,05$;
2. ** – відмінності статистично достовірні щодо значень контрольної патології, $p < 0,05$.

На етанол-преднізолоновій моделі ураження СОШ профілактично-лікувальне введення ЛЕТХ сприяло статистично достовірному ($p < 0,05$) зниженню у 2,8 рази вмісту ТБК-АП та у 2,3 рази активності КТ у сироватці крові у порівнянні з групою тварин КП. На органному рівні також відбувалася нормалізація процесів ПОЛ: спостерігали достовірне ($p < 0,05$) зниження у 2 рази вмісту ТБК-АП відносно тварин КП, але відновлення пулу ВГ було лише на рівні тенденції (рис. 2).

На моделі етанол-преднізолонового ураження СОШ у щурів ЛЕТХ виявив противиразкову дію, яка не поступалася за виразністю препарату порівняння рослинному збору «Гастрофіт», а за здатністю відновлювати баланс прооксидантних/антиоксидантних процесів ЛЕТХ переважав його.

Гістоморфологічні дослідження показали, що на моделі ураження СОШ ацетилсаліциловою кислотою, ЛЕТХ за виразністю позитивного впливу на морфологічний стан СОШ у дозі 20 мг/кг не поступався препарату порівняння олії обліпихи (рис. 3А). На моделі етанол-преднізолонової виразки шлунка у щурів під його впливом дещо обмежувалася глибина ураження залозистих трубок та виразність гемокапілярних розладів, зменшувалися ознаки набряку, стабілізувались

процеси мукоїдного синтезу, покращувався функціональний стан парієтальних та головних клітин шлунка (рис. 3Б). На даній експериментальній моделі патології шлунка при даній схемі введення і дозі, ЛЕТХ проявляв гастропротекторний ефект, який не поступався за ефективністю референс-препарату – збору «Гастрофіт», або дещо перевищував його (рис. 3Б).

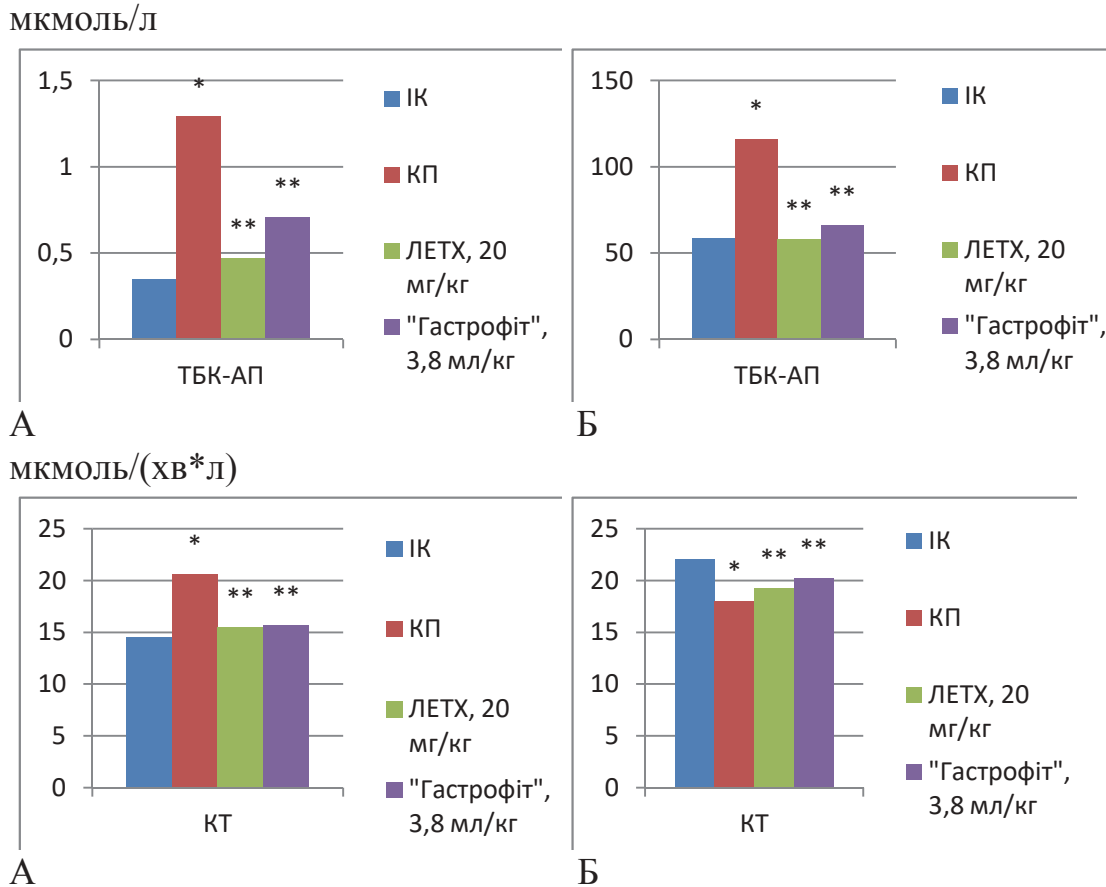


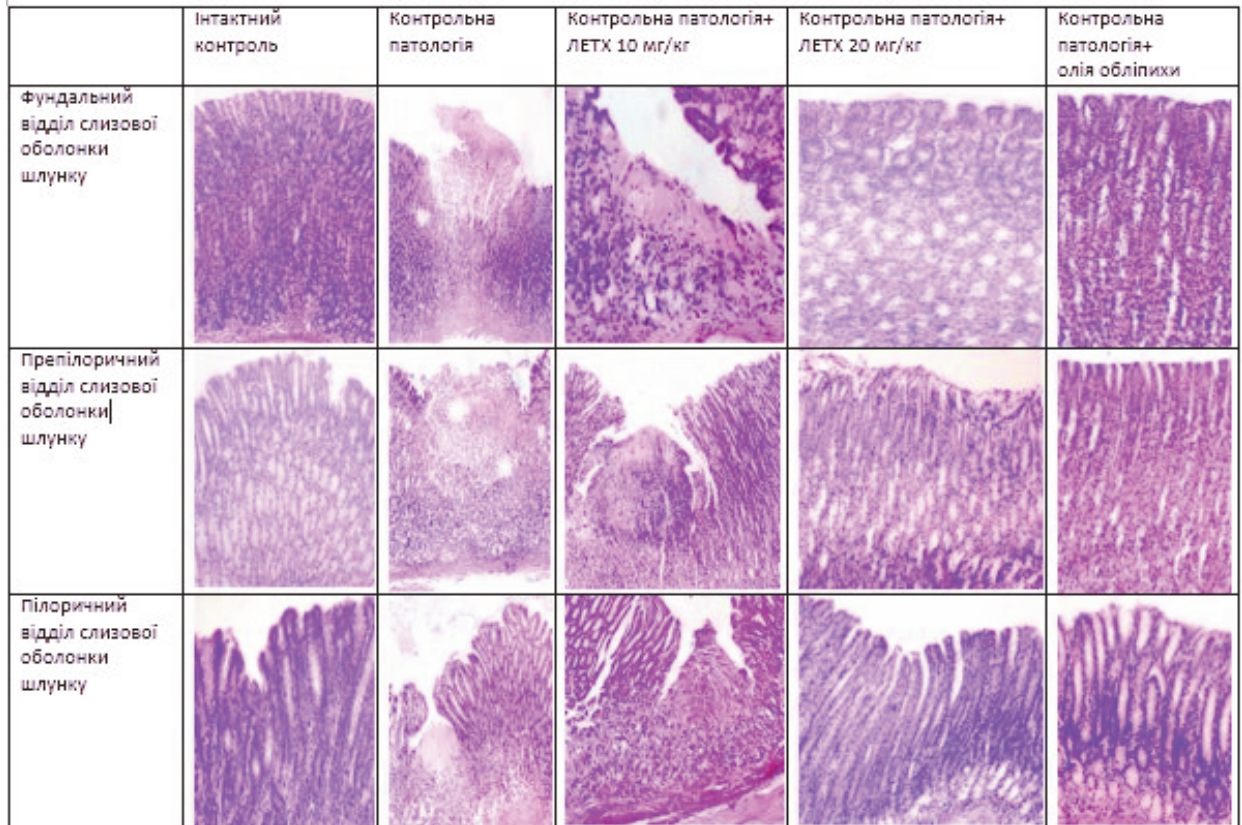
Рис. 2 Вплив ЛЕТХ на біохімічні показники сироватки крові (А) та гомогенату СОШ (Б) у щурів за етанол-преднізолонового ураження СОШ

Примітки:

1. * – відмінності статистично достовірні щодо значень інтактного контролю, $p < 0,05$;
2. ** – відмінності статистично достовірні щодо значень контрольної патології, $p < 0,05$.

ЛЕТХ показав позитивний результат на трьох моделях при вивченні мембраностабілізуючих властивостей: методом ORAC, на моделі тетрахлорметанового гепатиту у щурів та спонтанного гемолізу еритроцитів за методом F. S. Jager. Під дією ЛЕТХ у дозі 20 мг/кг спостерігалось достовірне зниження ($p < 0,05$) ступеня спонтанного гемолізу у дослідних тварин у порівнянні з групою ІК. Мембраностабілізуючий ефект був на рівні 28 %. Мембраностабілізуюча активність референс-препарату вітаміну Е становила 22 %. БАР ЛЕТХ мають здатність стабілізувати мембрани на рівні референс-препарату.

А



Б

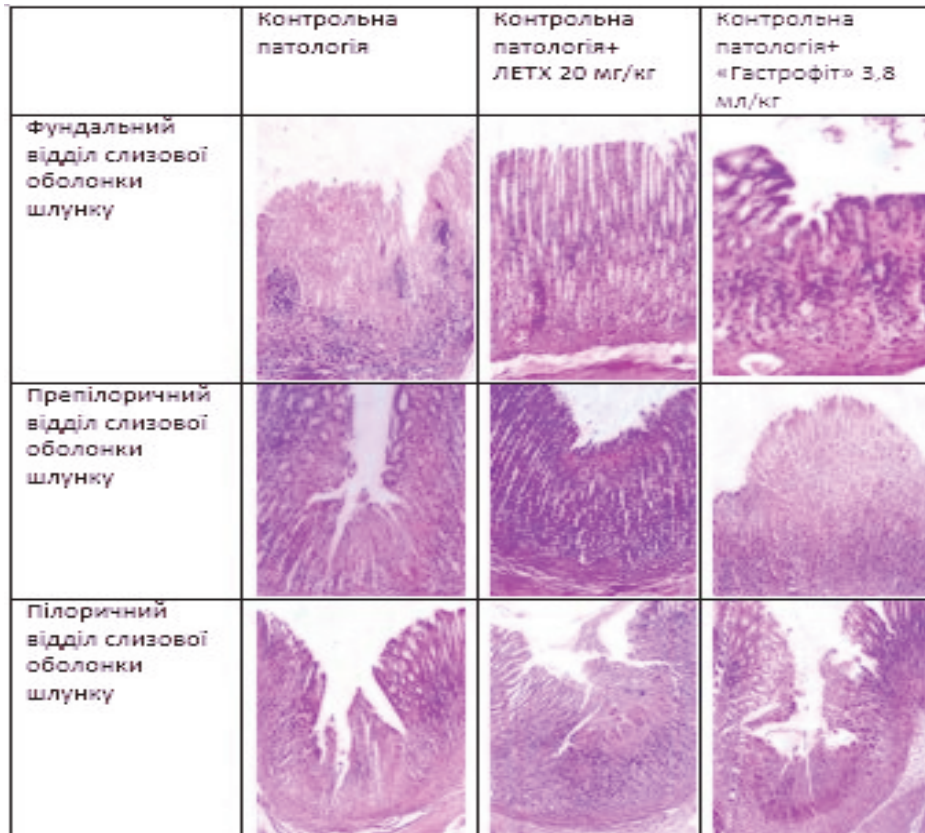


Рис. 3 Мікропрепарати слизової оболонки шлунка щурів за умов експериментального ураження шлунка ацетилсаліциловою кислотою (А) та етанол-преднізолоном (Б)

При вивченні мембраностабілізуючої активності ЛЕТХ методом ORAC встановлено, що його антиоксидантна активність склала $179,57 \pm 10,82$ mmolTE/100g DW, що свідчить, згідно з даними Schepetkin I. A. et al. (2016), про досить високу його активність.

На моделі тетрахлорметанового гепатиту у щурів визначено антицитолітичну та антиоксидантну активність ЛЕТХ. Його профілактично-лікувальне введення за умов тетрахлорметанового ураження печінки виявляло виразну антиоксидантну дію (у печінці вміст ТБК-реактивів зменшувався у 1,5 рази, рівень ВГ зростав у 1,5 рази, активність СОД та КТ збільшувалась відповідно на 31,8 % та 34,5 % порівняно з тваринами КП). Вище наведе вказує на нормалізацію систем АОС та ПОЛ під впливом БАР (сполук фенольної природи) ЛЕТХ.

ЛЕТХ покращував ознаки холестазу, зменшуючи активність ЛФ в крові в 1,4 разу порівняно з тваринами КП. ЛЕТХ сприяв достовірному ($p < 0,05$) зниженню синдрому цитолізу: зменшувалася активність АлАТ у 1,9 рази та АсАт у 1,3 разу відносно групи КП, під впливом реферес-препарату «Силібініну» активність даних показників зменшувалася у 1,8 і 1,2 разу. Це свідчить про виражений цитопротекторний ефект ЛЕТХ. Досліджуваний об'єкт, аналогічно як і реферес-препарат «Силібінін», зменшував прояви метаболічної дисфункції гепатоцитів – вміст у крові загального холестеролу зменшувався на 30,1 % і 34,0 %, загального білірубину – в 1,5 рази і 1,6 разу, рівень загального білка зростав на 34,6 % і 30,3 % відповідно у порівнянні з тваринами КП (табл. 1).

Таблиця 1

Біохімічні показники жовчі та стану печінки у щурів при тетрахлорметановому гепатиті ($M \pm m$, $n=7$)

Показники	Групи тварин			
	Контроль	КП	КП+ЛЕТХ	КП+силібінін
1	2	3	4	5
Сироватка крові				
Загальний білок, г/л	$60,5 \pm 1,11$	$37,3 \pm 1,56^*$	$50,2 \pm 1,24^{* \#}$	$48,6 \pm 1,18^{* \#}$
Загальний холестерол, ммоль/л	$1,75 \pm 0,09$	$3,65 \pm 0,10^*$	$2,55 \pm 0,06^{* \#}$	$2,41 \pm 0,08^{* \#}$
Загальний білірубін, моль/л	$13,8 \pm 0,84$	$27,9 \pm 0,69^*$	$18,6 \pm 0,48^{* \#}$	$17,8 \pm 0,41^{* \#}$
ЛФ, мкат/л	$3,28 \pm 0,08$	$7,64 \pm 0,12^*$	$5,35 \pm 0,10^{* \#}$	$5,12 \pm 0,12^{* \#}$
АлАТ, ммоль/л·год	$0,62 \pm 0,04$	$5,52 \pm 0,20^*$	$2,95 \pm 0,24^{* \#}$	$3,12 \pm 0,19^{* \#}$
АсАТ, ммоль/л·год	$0,84 \pm 0,08$	$3,44 \pm 0,17^*$	$2,71 \pm 0,19^{* \#}$	$2,84 \pm 0,17^{* \#}$
АсАТ / АлАТ	$1,35 \pm 0,10$	$0,63 \pm 0,04^*$	$0,93 \pm 0,04^{* \#}$	$0,92 \pm 0,05^{* \#}$
Гомогенат печінки				
ТБК-реактанти, нмоль/мг протеїну	$10,6 \pm 0,51$	$22,8 \pm 1,86^*$	$15,4 \pm 0,39^{* \#}$	$16,2 \pm 0,47^{* \#}$
ВГ, моль/мг протеїну	$5,24 \pm 0,08$	$2,48 \pm 0,11^*$	$3,89 \pm 0,09^{* \#}$	$3,75 \pm 0,10^{* \#}$

1	2	3	4	5
СОД, ум. од./мг протеїну	8,15±0,31	5,11±0,13*	6,74±0,17*#	6,60±0,15*#
КТ мкмоль/хв·мг протеїну	85,2±3,15	51,9±2,68*	69,8±2,17*#	66,4±2,08*#
Жовч				
Загальні жовчні кислоти, мг%	790,0±20,4	345±14,4*	589±14,1*#	615±13,5*#
Загальний холестерол, мг%	24,2±0,70	7,11±0,36*	14,5±0,27*#	15,1±0,31*#
Холато-холестероловий коефіцієнт	32,7±0,75	48,8±1,75*	40,7±1,02*#	40,8±1,18*#

Примітки:

1. * - статистично достовірна відмінність ($p < 0,05$) відносно показників контролю;
2. # - статистично достовірна відмінність ($p < 0,05$) відносно показників контрольної патології;
3. n – кількість тварин у групі

Гістологічно підтверджено, що під впливом ЛЕТХ виразно активувалися регенераторні процеси, покращувався морфологічний стан печінки щурів, відновлювалася гістологічна будова паренхіми печінки у 80 % щурів.

До реалізації гастропротекторної активності ЛЕТХ може долучатися проти-запальна активність його БАР. Результати досліджень показали, що на моделі карагенінового набряку ЛЕТХ виявив достовірну ($p < 0,05$) антиексудативну дію, активність якої у цій серії склала 32 % і за виразністю в 1,5 рази поступалася референс-препарату натрію диклофенаку, активність якого у дозі 8 мг/кг склала 47 %. На моделі зимозанового набряку ЛЕТХ виявив антиексудативну активність на рівні препарату порівняння гранул кверцетину – 44 % і 43 % відповідно (рис. 4).

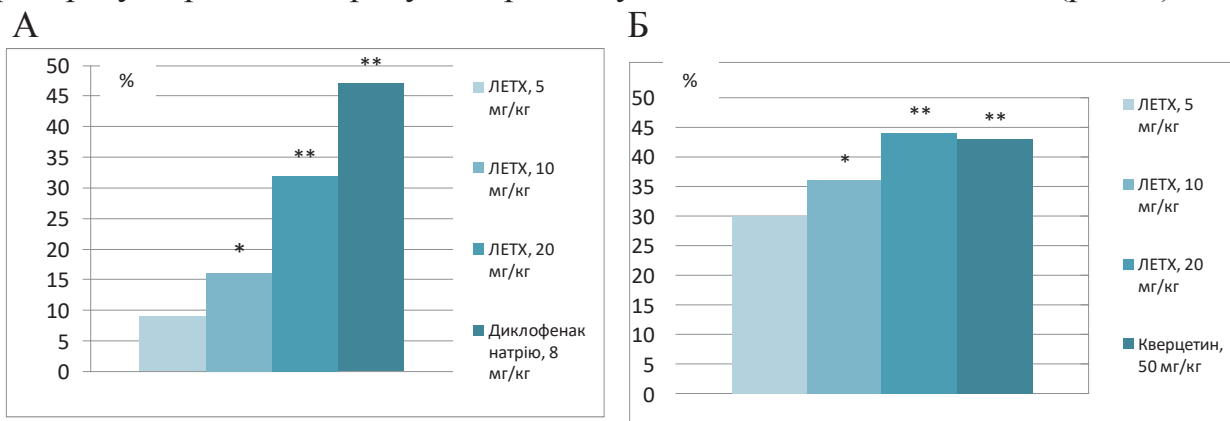


Рис. 4 Антиексудативна активність збору антидіабетичного та препаратів порівняння на моделі карагенінового (А) та зимозанового (Б) набряку у щурів

Примітка * – відмінності статистично значущі по відношенню до контрольної патології, критерій Манна-Уїтні, $p \leq 0,05$.

ЛЕТХ виявив виражені антиальтеративні властивості, які вивчали на моделі асептичного запалення шкіри у щурів. Спостерігали прискорення загоєння ранового процесу, за ефективністю якого ЛЕТХ не поступався препарату порівняння натрію диклофенаку. Встановлено також помірну антипроліферативну активність ЛЕТХ (на рівні 25 %), яка достовірно ($p < 0,05$) не поступалася активності референс-препарату натрію диклофенаку (20 %).

Враховуючи, що ВХ часто супроводжується больовим синдромом, вивчали анальгетичну активність досліджуваного об'єкту на моделі оцтовокислих корчів у мишей. Результати досліджень показали виразну анальгетичну дію ЛЕТХ, яка у дозі 20 мг/кг склала 79 %, та у 1,2 разу поступалася синтетичному референс-препарату натрію метамізолу, активність якого склала 94 %.

ЛЕТХ проявляв дозозалежну кровоспинну дію. У дозі 20 мг/кг вона була на рівні 29 %.

Результати вивчення антимікробної дії ЛЕТХ на різні мікроорганізми показали, що він виявляє бактерицидну дію на грампозитивну мікрофлору (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), бактеріостатичну – до грибів роду *Candida*.

Отже, дослідження показали, що ЛЕТХ виявляє виражену противиразкову активність, має антиоксидантні, мембраностабілізуювальні, гепатопротекторні, протизапальні, анальгетичні, ранозагоювальні, кровоспинні, антимікробні властивості, що було підтверджено біохімічними, мікробіологічними та гістологічними показниками. Широкий спектр фармакологічних ефектів досліджуваній екстракт проявляє за наявності достатньої кількості біологічно активних речовин, які були виявлені під час фітохімічного дослідження.

Результати роботи експериментально обґрунтовують доцільність подальшого дослідження ЛЕТХ та впровадження його як ефективного рослинного гастропротекторного засобу для застосування як з профілактичною метою, так і в комплексній фармакотерапії ВХ.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота присвячена вирішенню актуального наукового завдання, яке полягає в експериментальному вивченні безпечності та встановленні фармакологічних властивостей ліофілізованого екстракту з трави хамерію вузьколистого, обґрунтуванні доцільності його використання у лікуванні та профілактиці виразкової хвороби. Теоретично узагальнено та експериментально обґрунтовано доцільність подальшого вивчення екстракту з метою створення противиразкового лікарського засобу на його основі. Показано зв'язок між фармакологічною активністю досліджуваного ліофілізованого екстракту з трави хамерію вузьколистого та його хімічним складом.

1. У результаті проведеного фітохімічного дослідження трави хамерію вузьколистого ідентифіковано та визначено кількісний вміст біологічно активних речовин, що зумовлюють його фармакологічну активність: органічні кислоти, в тому числі аскорбінова, жирні та амінокислоти (16 вільних та 17 зв'язаних), вуглеводи (полісахариди, моносахариди, пектинові речовини), сполуки фенольної природи (дубильні речовини, флавоноїди, гідроксикоричні кислоти), ефірна олія,

макро- та мікроелементи (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd, P, Ni). Одержано ліофілізований екстракт з трави хамерію вузьколистого (ЛЕТХ), визначено в ньому сполуки фенольної природи – гідроксикоричні кислоти ($9,68 \pm 0,16$) %, флавоноїди ($12,52 \pm 0,02$) %, поліфенольні сполуки ($24,38 \pm 0,30$) %.

2. Встановлено, що ЛЕТХ за класифікацією К. К. Сидорова належить до IV класу токсичності – малотоксичні речовини, $LD_{50} \geq 5000$ мг/кг. При визначенні цитотоксичності ЛЕТХ *in vitro* на культурі клітин HepG2 встановлено, що причиною загибелі клітин при дослідженні є апоптоз. Введення екстракту здоровим тваринам показало, що препарат не чинить місцево подразнювальної (ульцерогенної) дії при внутрішньошлунковому введенні у дозі 20 мг/кг та не проявляє місцево подразнювальних властивостей на слизову оболонку ока кролів.

3. На моделі аспіринової виразки шлунка у щурів встановлено противиразкову активність ЛЕТХ та визначено його умовно-ефективну дозу – 20 мг/кг. Під впливом досліджуваного екстракту противиразкова активність у дозі 20 мг/кг склала 69 %; під впливом препарату порівняння – настою збору «Гастрофіт» – 61 %. Механізм противиразкової активності екстракту при цьому патологічному процесі, ймовірно, обумовлений впливом компонентів екстракту на процеси ліпопероксидації, мітохондріального дихання та гемостазу, що підтверджено результатами біохімічних досліджень. Встановлено, що за введення екстракту знижувалася інтенсивність процесів ліпопероксидації, відновлювався антиоксидантний та енергетичний баланс клітин слизової оболонки шлунка. Лікувально-профілактичне введення ЛЕТХ сприяло статистично достовірному ($p < 0,05$) зниженню вмісту ТБК-АП у гомогенатах слизової оболонки шлунка у 2,2 рази, підвищенню вмісту відновленого глутатіону у 1,4 рази та нормалізації ферментативної активності сукцинатдегідрогенази порівняно з контрольною патологією. Екстракт виявив нормалізуючий вплив на показники згортальної ланки гемостазу – протромбіновий час та активований частковий тромбoplastиновий час. Гістоморфологічними дослідженнями показано, що застосування екстракту за ураження ацетилсаліциловою кислотою позитивно впливає на морфологічний стан слизової оболонки шлунка, зменшуючи альтеративні прояви, гемокапілярні розлади і набряк строми, відновлюючи слизовий бар'єр.

4. На моделі етанол-преднізолонової виразки у щурів підтверджено противиразкову активність ЛЕТХ. Під впливом досліджуваного екстракту, як і під впливом препарату порівняння настою збору «Гастрофіт», противиразкова активність склала 49 %. Лікувально-профілактичне введення сприяло статистично достовірному ($p < 0,05$) зниженню у 2,8 рази вмісту ТБК-АП та у 2,3 рази активності каталази у сироватці крові порівняно з групою тварин контрольної патології. За здатністю відновлювати баланс прооксидантних/антиоксидантних процесів ЛЕТХ переважав препарат порівняння. Гістоморфологічними дослідженнями доведено, що застосування досліджуваного екстракту не запобігає розвитку патологічного процесу у слизовій оболонці шлунка при даному ураженні, але під його впливом знижується глибина ураження залозистих трубок та виразність гемокапілярних розладів, зменшуються ознаки набряку, стабілізуються процеси мукоїдного синтезу, відновлюється стан паріетальних та головних клітин слизової шлунка.

5. На моделі гострого тетрахлоретанового гепатиту встановлено мембрано-протекторну дію ЛЕТХ. Застосування екстракту приводить до зниження активності процесів ліпопероксидації та підвищення антиоксидантного захисту в печінці – вміст ТБК-реактивних зменшувався у 1,5 разу, рівень відновленого глутатіону зростав в 1,5 разу, активність супероксиддисмутази та каталази збільшувалась відповідно на 31,8 % та 34,5 % порівняно з тваринами контрольної патології. За повторного введення екстракту зменшувалися прояви холестазу, на що вказує зниження активності лужної фосфатази в крові у 1,4 разу. Про зниження активності процесів цитолізу свідчить зменшення активності аланінамінотрансферази в 1,9 разу та аспартатамінотрансферази у 1,3 разу відносно групи контрольної патології. Гепатозахисний вплив ЛЕТХ підтверджено гістоморфологічними дослідженнями.

6. На моделі ексудативного карагенінового та зимозанового набряку лапи у щурів встановлена протизапальна активність досліджуваного екстракту у дозі 20 мг/кг, яка склала 32 % і 44 % відповідно. Можна припустити, що у механізмі його протизапальної активності більш ймовірна антиліпоксигеназна, а ніж антициклон-оксигеназна активність та мембранопротекторні властивості. Екстракт проявив мембраностабілізуючу активність (28 %) у дозі 20 мг/кг на рівні вітаміну Е (22 %); анальгетичну активність (79 %), яка поступалася натрію метамізолу (94 %); кровоспинну активність, про що свідчило зменшення часу згортання крові щурів у дозі 20 мг/кг на 29 %; ранозагоювальну активність на рівні препарату порівняння.

7. У результаті вивчення антимікробної дії ліофілізованого екстракту трави хамерію вузьколистого *in vitro* методом серійних розведень встановлено, що найбільш чутливою до нативного розчину екстракту була грампозитивна флора (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), про що свідчила наявність бактерицидного ефекту. До грибів роду *Candida* досліджуваний екстракт проявляв бактериостатичну активність. Грамнегативні бактерії (*Escherichia coli*) не були чутливими до екстракту. Методом дифузії в агар підтверджено результати, які були одержані методом серійних розведень. Затримка росту тест-культур була найбільш вираженою при використанні ліофілізованого екстракту трави хамерію вузьколистого щодо *Staphylococcus aureus* ($d=20\pm 2,3$) мм та *Bacillus cereus* ($d=25\pm 2,2$) мм, менше вираженою щодо грибів роду *Candida* ($d=15\pm 1,5$) мм).

8. Доведений спектр фармакологічних властивостей ліофілізованого екстракту трави хамерію вузьколистого обґрунтовує доцільність проведення подальших доклінічних та клінічних досліджень з метою створення на його основі нового лікарського засобу для профілактики та лікування захворювань ШКТ.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дослідження ліпофільної фракції трави хамерію вузьколистого / С. М. Марчишин, Н. В. Красуля, М. І. Куліцька, Г. І. Островська. *Фармацевтичний часопис*. 2011. № 1. С. 18-21.

2. *Epilobium angustifolium* L.: A medicinal plant with therapeutic properties / Н. Ostrovska, О. Oleshchuk, S. Vannini, S. Cataldi, E. Albi, M. Codini, A. Moulas, S. Marchyshyn, T. Beccari, M. R. Ceccarini. *The EuroBiotech Journal*. 2017. Vol. 1, issue 2. P. 126-131.

3. Investigation of phenolic compounds content in *Chamerion angustifolium* L. herb freeze-dried extract / H. Feshchenko, O. Oleshchuk, M. Lukanyuk, B. Feshchenko. *The Pharma Innovation Journal*. 2017. № 6 (3). P. 40-43.

4. Олещук О. М., Фещенко Г. І. Вивчення гепатопротекторної дії ліофілізованого екстракту з трави хамерію вузьколистого. *Фітотерапія часопис*. 2018. № 3. С. 22-25.

5. Вивчення антиексудативної активності ліофілізованого екстракту з трави хамерію вузьколистого / О. М. Олещук, Г. І. Фещенко, С. М. Марчишин, О. Ю. Кошова. *Фітотерапія. Часопис*. 2019. № 1. С. 55-60.

6. Вивчення противиразкової дії ліофілізованого екстракту трави хамерію вузьколистого на моделі етанол-преднізолонового ураження шлунка у щурів / Г. І. Фещенко, О. М. Олещук, С. М. Марчишин, О. Ю. Кошова. *Клінічна фармація*. 2019. Т. 23, № 1. С. 11-18.

7. Experimental study of antiulcerogenic action of *Chamaenerionangustifolium* the aspirin induced gastric ulcer modeling the rats / H. I. Feshchenko, O. M. Oleshchuk, S. M. Marchyshyn, S. S. Nakonechna. *The Pharma Innovation Journal*. 2019. № 8(5). P. 535-539.

8. Дослідження впливу ліофілізованого екстракту хамерію вузьколистого на гістологічний стан слизової оболонки шлунка щурів на моделі етанол-преднізолонової виразки / Г. І. Фещенко, О. М. Олещук, С. М. Марчишин, О. П. Андрієшин. *Клінічна фармація*. 2019. Т. 23, № 3. С. 28-37.

9. Пат. № 122804 Україна, МПК (2017.01) А61N 65/00 А61К 9/19 (2006/01) А61Р 29/00. Спосіб одержання фармакологічно активної субстанції з протизапальною та антимікробною дією / Марчишин С. М., Фещенко Г. І., Олещук О. М., Козир Г. Р., Ткачук Н. І., Кошова О. Ю. u 2017 08078; заявл. 03.08.2017; опубл. 25.01.2018, Бюл. № 2.

10. Островська Г. І., Калушка О. Б Вміст органічних кислот та аскорбінової кислоти у траві хамерію вузьколистого. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів*: матер. 43 Всеукр. наук.-практ. конф. студ. та мол. вчених (19-20 квітня 2012 р.). Х.: НФаУ, 2012. С. 97.

11. Ostrovska H. Determination the contents of phenolic compounds in the herb of *Chamerion angustifolium*. *Plant – the source of research material* : materials of 2nd International conference and workshop (18-20 October 2012). Lublin, 2012. P. 273.

12. Островська Г. І. Дослідження вмісту гідроксикоричних кислот у траві хамерію вузьколистого (*Chamerion angustifolium* L.). *Матеріали XVIII Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених* (Тернопіль, 28-30 квітня 2014 р.). Тернопіль: Укрмедкнига, 2014. С. 256.

13. Марчишин С. М., Островська Г. І. Дослідження вмісту ефірних олій у траві хамерію вузьколистого. *Лікарські рослини: традиції та перспективи досліджень*: матер. 2-ої Міжнар. наук. конф. молодих вчених (м. Березоточа, 4-5 червня 2014 р.). Березоточа : Комун. вид-во «Лубни», 2014. С. 173-174.

14. Островська Г. І., Марчишин С. М. Вміст дубильних речовин у траві хамерію вузьколистого. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин*: матер. I Міжнародної науково-практичної internet-конференції, 20-21 березня 2014 р. Харків, 2014. С. 128.

15. Олещук О. М., Островська Г. І., Марчишин С. М. Вміст жирних кислот і пігментів і ліпофільному екстракті трави хамерію вузьколистого. *Хімія природних сполук* : матер. IV Всеукраїнської науково практичної конф. з міжнародною участю (м. Тернопіль, 21-22 квітня 2016 р.) / редкол.: С. М. Марчишин, Л. С. Фіра, К. А. Посохова, О. М. Олещук. Тернопіль: ТДМУ, 2016. С. 39-40.

16. Олещук О. М., Фещенко Г. І. Дослідження кількісного вмісту дубильних речовин у ліофілізованому екстракті трави хамерію вузьколистого. *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матер. VI науково-практ. конф. з міжнародною участю, 10-11 листопада 2016 року, Тернопіль. Тернопіль: Укрмедкнига, 2016. С. 318-319.

17. Островська Г. І. Фітохімічне дослідження трави хамерію вузьколистого (*CHAMERION ANGUSTIFOLIUM* L.). *Матеріали XX Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених* (Тернопіль, 25-27 квітня 2016 р.). Тернопіль: Укрмедкнига, 2016. С. 342.

18. Островська Г. І., Олещук О. М. Дослідження цитотоксичності ліофілізованого екстракту хамерію вузьколистого трави (*Chamerion angustifolium* (L.)). *Фармація XXI століття : тенденції та перспективи* : матеріали VIII Нац. з'їзду фармацевтів України (Харків, 13-16 вересня, 2016 р.): у 2 т. Т. 2 / М-во охорони здоров'я України, Нац. фармац. ун-т; кол.: В. П. Черних (голова) та ін.; С. Ю. Данильченко та ін. Харків: НФаУ, 2016. С. 91.

19. Дослідження антимікробних властивостей ліофілізованого екстракту трави хамерію вузьколистого (*Chamerion angustifolium* (L.)) / Г. І. Фещенко, О. М. Олещук, Н. І. Ткачук, М. І. Луканюк. *V національний з'їзд фармакологів України*, матер. V національного з'їзду фармак., 18-20 жовтня 2017 р., Запоріжжя, 2017. С. 130-131.

20. Кошова О. Ю., Фещенко Г. І. Вивчення анальгетичної дії ліофілізованого екстракту з трави хамерію вузьколистого. *Ліки – людині. Сучасні проблеми фармакотерапії і призначення лікарських засобів*: матеріали II Міжнар. наук.-практ. конф. (28-29 березня 2018 року) / у 2-х т. X. : НФаУ, 2018. Т. 2. С. 180.

21. Фещенко Г. Мембраностабілізуюча активність ліофілізованого екстракту трави хамерію вузьколистого. *Матеріали XXII Міжнародного медичного конгресу студентів та молодих вчених* (Тернопіль, 23-25 квітня 2018 р.). Тернопіль: Укрмедкнига, 2018. С. 196-197.

22. Фещенко Г. І., Олещук О. М. Дослідження ульцерогенної та місцевоподразнювальної дії ліофілізованого екстракту трави хамерію вузьколистого. *Актуальні питання фармакології та фармакотерапії*: матеріали Всеукраїнської науково-практ. конференції (Тернопіль, 26-27 вересня 2019 р.) / Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України. Тернопіль: ТНМУ, 2019. С. 72.

23. Олещук О. М., Фещенко Г. І., Марчишин С. М. Вплив ліофілізованого екстракту трави хамерію вузьколистого на альтеративну та проліферативну фази запалення. *Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації* : матеріали наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 22-23 жовтня 2019 р. / редкол. : А. А. Котвіцька та ін. X. : НФаУ, 2019. С. 285.

АНОТАЦІЯ

Фещенко Г. І. Фармакологічне обґрунтування застосування екстракту хамерію вузьколистого як противиразкового засобу. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2020.

Вивчено хімічний склад трави хамерію вузьколистого та ліофілізованого екстракту (ЛЕТХ), одержаного з досліджуваної трави, а також досліджено його фармакологічну активність. Встановлено, що ЛЕТХ містить значну кількість сполук фенольної природи (флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, дубильні речовини), полісахариди, органічні кислоти, ефірну олію, аскорбінову кислоту, жирні кислоти, макро- і мікроелементи, які забезпечують його фармакологічну дію.

Вивчено противиразкові, гепатопротекторні, мембраностабілізуювальні, антиоксидантні, протизапальні, анальгетичні, ранозагоювальні, кровоспинні, властивості ЛЕТХ. Встановлено, що він чинить антимікробну дію на грампозитивну мікрофлору (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) та гриби роду *Candida spp.*

Встановлено, що ЛЕТХ у дозі 20 мг/кг проявляє виразну противиразкову активність на моделі виразки шлунка у щурів, викликаній ацетилсаліциловою кислотою, та на етанол-преднізолоновій моделі ураження слизової оболонки шлунка. Гастропротекторну активність ЛЕТХ підтверджено гістологічно.

За показником гострої токсичності ЛЕТХ за класифікацією К. К. Сидорова відноситься до IV класу токсичності – малотоксичні речовини, $LD_{50} \geq 5000$ мг/кг. ЛЕТХ не проявляє ульцерогенної та місцевоподразнювальної дії.

Ключові слова: ліофілізований екстракт, трава, хамерій вузьколистий, біологічно активні речовини, виразкова хвороба шлунка, гастропротекторна активність, антиоксидантна, мембраностабілізуювальна, анальгетична, антимікробна, протизапальна дії.

АННОТАЦИЯ

Фещенко Г. И. Фармакологическое обоснование применения экстракта хамерия узколистного как противоязвенного средства. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2020.

Изучен химический состав травы хамерия узколистного и лиофилизированного экстракта (ЛЭТХ), полученного из исследуемой травы, а также исследована его фармакологическая активность. Установлено, что ЛЭТХ содержит значительное количество соединений фенольной природы (флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, дубильные вещества), полисахариды, органические кислоты, эфирное масло, аскорбиновую кислоту, жирные кислоты, макро- и микроэлементы, которые обеспечивают его фармакологическое действие.

Изучены противоязвенные, гепатопротекторные, мембраностабилизирующие, антиоксидантные, противовоспалительные, анальгетические, ранозаживляющие,

кровоостанавливающие свойства ЛЭТХ. Установлено, что он оказывает антимикробное действие в отношении грамположительной микрофлоры (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) и грибов рода *Candida spp.*

Установлено, что ЛЭТХ в дозе 20 мг/кг проявляет выраженную противоязвенную активность на модели язвы желудка у крыс, вызванной ацетилсалициловой кислотой, и на этанол-преднизолоновой модели поражения слизистой оболочки желудка. Гастропротекторная активность ЛЭТХ подтверждена гистологически.

По показателю острой токсичности ЛЭТХ по классификации К. К. Сидорова относится к IV классу токсичности – малотоксичные вещества, $LD_{50} \geq 5000$ мг/кг. ЛЭТХ не проявляет ulcerогенного и местнораздражающего действия.

Ключевые слова: лиофилизированный экстракт, трава, хамерий узколиственный, биологически активные вещества, язвенная болезнь желудка, гастропротекторная активность, антиоксидантное, мембраностабилизирующее, анальгетическое, антимикробное, противовоспалительное действие.

ABSTRACT

Feshchenko H. I. Pharmacological substantiation for the use of fireweed *Chamaenerion angustifolium* extract as an antiulcer agent. – Qualifying thesis manuscript copyright.

Thesis for the degree of the Candidate of Pharmaceutical Sciences (PhD) in specialty 14.03.05 Pharmacology (22 – Public Health). – National University of Pharmacy, Kharkiv, Ministry of Health of Ukraine, 2020.

The chemical composition of the fireweed (*Chamaenerion angustifolium*) herb and lyophilized extract (LEFH) obtained from the studied herb and its pharmacological activity was researched. It was established that LEFH contains a significant amount of phenolic compounds (flavonoids, hydroxycinnamic acids, tannins), polysaccharides, organic acids, essential oil, ascorbic acid, fatty acids, macro- and microelements, which provide its pharmacological effect.

The antiulcer, hepatoprotective, membrane stabilizing, antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, wound healing, hemostatic properties of LEFH were studied. It was established that it has an antimicrobial effect against gram-positive microflora (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) and fungi of the genus *Candida spp.*

It was found that LEFH at a dose of 20 mg/kg exhibits pronounced antiulcer activity in the model of gastric ulcer in rats caused by acetylsalicylic acid, and in the ethanol-prednisolone model of lesions of the gastric mucosa.

When studying the anti-ulcer effect of LEFH on a model of gastric ulcer in rats caused by acetylsalicylic acid, it was found that the introduction of the extract in the treatment and prophylactic mode stimulated reparative processes in the areas of the ulcer defect. The anti-ulcer activity of LEFH at a dose of 20 mg/kg in this model was 69 % and was almost not inferior in effectiveness to the activity of the comparative drug GASTROPHYTUM herbal tea (61%).

In this model, LEFH facilitated a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in the content of TBA-AP in homogenates of the gastric mucosa by 2.2 times compared with the control pathology, an increase in the content of reduced glutathione by 1.4 times compared with the control pathology was observed and normalization of succinate dehydrogenase – 1.51 $\mu\text{mol/g}$ and 1.45 $\mu\text{mol/g}$ in the intact control group. LEFH contributed to the normalization of the parameters of the coagulation link of hemostasis – prothrombin time and activated partial thromboplastin time statistically significantly ($p < 0.05$) decreased 1.5 times and 1.4 times, respectively, compared with control pathology. Simultaneously with an improvement in the indicators of the coagulation link of hemostasis, there was a significant ($p < 0.05$) decrease in fibrinogen concentration from 1.96 g/l (control pathology) to 1.39 g/l, which indicated a decrease in the severity of inflammation of the rat's gastric mucosa.

On the ethanol-prednisolone model of gastric mucosa lesions showed that its therapeutic and prophylactic administration of LEFH contributed to a statistically significant ($p < 0.05$) reduction in 2.8 times of the content of TBA-AP and 2.3 times the activity of catalase in blood serum compared with the group of animals of the control pathology. In the homogenate of the gastric mucosa, a reliable ($p < 0.05$) 2-fold decrease in the content of TBA-AP was observed in animals of the control pathology, but the recovery of the pool of restored glutathione was at the level of the trend. In this model, the anti-ulcer effect of LEFH was not inferior in expressiveness to the comparative drug for GASTROPHYTUM herbal tea, and in its ability to restore the balance of prooxidant/antioxidant processes, LEFH prevailed.

The gastroprotective activity of LEFH is histologically confirmed.

According to the acute toxicity index LEFH according to the classification of K.K. Sidorov, belongs to the toxicity class IV – low toxic substances, $\text{LD}_{50} \geq 5000 \text{ mg/kg}$. LEFH does not show ulcerogenic, locally irritating effect.

The results of the study by the Comet method indicate an important and severe genotoxic effect induced by lyophilized extract of *Chamaenerion angustifolium* herb in concentrations of 50 and 75 $\mu\text{g/ml}$. The results obtained in the analysis of DNA fragmentation showed an increase in the dependence of “dose-response” and the percentage of cells with fragmented DNA at all concentrations and at both variants of the exposure time of the extract. These results are similar to those found in the Comet analysis and suggest that DNA damage may be caused by late apoptosis.

Key words: lyophilized extract, herb, fireweed (*Chamaenerion angustifolium*), biologically active substances, gastric ulcer, gastroprotective activity, antioxidant, membrane stabilizing, analgesic, antimicrobial, anti-inflammatory effects.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АЕА – антиексудативна активність
АОС – антиоксидантна система
АлАТ – аланінамінотрансфераза;
АЧТВ – активований частковий тромбопластиновий час;
АсАТ – аспартатамінотрансфераза;
АЧТВ – активований частковий тромбопластиновий час;
БАР – біологічно активні речовини;
ВХ – виразкова хвороба;
ДФУ – Державна Фармакопея України;
ІК – інтактний контроль;
КП – контрольна патологія;
КТ – каталаза;
ЛЕТХ – ліофілізований екстракт трави хамерію вузьколистого;
ЛФ – лужна фосфатаза;
НФаУ – Національний фармацевтичний університет;
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів;
СДГ – сукцинатдегідрогеназа;
СОД – супероксиддисмутаза;
СОШ – слизова оболонка шлунка;
ТБК-АП – ТБК-активних продуктів
LD₅₀ – середньолетальна доза.

Підписано до друку 03.09.2020 р. Формат 60×84/16.
Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman. Друк цифровий.
Ум. друк. арк. 0,9. Наклад 100 пр. Зам. № б/н.
Надруковано СПД ФО Степанов В. В., м. Харків, вул. Ак. Павлова, 311
Свідоцтво про державну реєстрацію В00 № 941249 від 28.01.2003 р.

