ВПЛИВ ПОЛІФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ "ЛОКОРИН" НА РІЗНІ СТАДІЇ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ

Л.В.Галузинська, О.І.Набока, Л.М.Вороніна, О.П.Тимошенко

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: лікарські засоби рослинного походження; антиексудативна активність; антипроліферативна та антиальтеративна активність; запалення

Пошук нових препаратів серед субстанцій рослинного походження з протизапальною дією є актуальним і одним з пріоритетних напрямків сучасної медицини. Попередніми дослідженнями, проведеними на кафедрі біохімії НФаУ, була доведена перспективність використання рослинного поліфенольного комплексу "Локорин", технологія одержання якого була розроблена на кафедрі фармакогнозії. Спираючись на те, що основними діючими речовинами екстракту "Локорин" є поліфенольні сполуки, ідентифіковані як оксикоричні кислоти, кумарини, фенілкарбонові кислоти, флавоноїди тощо, ми припустили, що екстракт, можливо, має протизапальні властивості. Вивчення протизапальних властивостей (антиексудативної, антипроліферативної та антиальтеративної активності) при його пероральному використанні і було метою нашої роботи. Проведені експерименти показали, що екстракт "Локорин" у дозі 50 мг/кг позитивно впливає на перебіг фази ексудації на різних моделях набряку, проявляє помірну антипроліферативну активність, яка співпадає з активністю референс-препарату, впливає на загоювання трафаретних ран та нормалізує деякі гематологічні показники.

Запалення є причиною і проявом багатьох патологічних станів і складає патофізіологічну основу більшості захворювань людини [14]. Тривале застосування нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП) спричиняє низку побічних ефектів, особливо з боку органів травлення [6, 11, 13]. Тому пошук нових препаратів серед субстанцій рослинного походження з протизапальною дією є одним з пріоритетних напрямків сучасної медицини [1, 9, 12]. Перевагою препаратів рослинного походження є незначна токсичність, м'яка та пролонгована дія, відсутність побічних ефектів. Попередніми дослідженнями, які виконувалися на кафедрі біохімії НФаУ, була встановлена перспективність використання рослинного поліфенольного комплексу "Локорин". Технологія його одержання з надземної частини Лядвенця рогатого була розроблена на кафедрі фармакогнозії під керівництвом професора В.М.Ковальова. Виходячи з того, що основними діючими речовинами комплексу "Локорин" є поліфенольні сполуки, ідентифіковані як оксикоричні кислоти, кумарини, фенілкарбонові кислоти, флавоноїди тощо, ми припустили, що екстракт, можливо, має протизапальні властивості [4]. Останнім часом доведена провідна роль вільних радикалів у початку та розвитку запальної реакції. Протизапальний ефект поліфенолів пояснюється саме їх антиоксидантною дією. З одного боку, завдяки наявності гідроксильних груп вони є пастками для вже утворених вільних радікалів. З іншого, вони здатні зв'язувати іони металів, не даючи їм запустити каскад вільнорадикальних реакцій. Важливою особливістю біофлавоноїдів є їх здатність інгібувати ліпооксигеназу — фермент, який перетворює арахідонову кислоту на лейкотрієни. Деякі лейкотрієни переносять нейтрофіли до місця запалення і активізують їх, тим самим послаблюючи запалення [7, 8, 10, 13].

Метою даної роботи було вивчення протизапальних властивостей поліфенольного комплексу "Локорин" при пероральному використанні (антиексудативної, антипроліферативної та антиальтеративної активності).

Матеріали та методи

Для вивчення антиексудативної активності екстракту "Локорин" було відтворене гостре асептичне запалення у 84 щурів масою 200-230 г. Для цього використовували 0,1 мл 1% розчину карагеніну на тварину та 0,1 мл 2% суспензії зимозану на тварину, які вводили субплантарно. Екстракт "Локорин" в дозах 10, 25, 50 та 100 мг/кг і препарати порівняння інгібітор циклооксигенази — ортофен у дозі 8 мг/кг та інгібітор ліпооксигенази — кверцетин у дозі 5 мг/кг тварини отримували за 1 год до введення флогогенів. Розмір зимозанового набряку вимірювали через 0,5 год,

Л.В.Галузинська — здобувач кафедри біологічної хімії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

Таблиця 1

Антиексудативна активність екстракту "Локорин" на моделях карагенінового та зимозанового набряків у порівнянні (n=84)

Група тварин	Доза, мг/кг	Кількість тварин	Модель набряку			
			карагенінновий набряк		зимозановий набряк	
			величина набряку, ум.од.	антиексудативна активність, %	величина набряку, ум.од.	антиексудативна активність, %
Контроль		7	35,7±6,3	-	30,62±3,9	-
Локорин	10	7	34,7±6,3	2,8	18±3,7*	41,2
Локорин	25	7	21,4±4,8*	40	12,25±4,1*	56,7
Локорин	50	7	19,8±5,1*	44,5	13,25±4,3*	59,9
Локорин	100	7	34,1±8,3	4,4	16,5±2,3*	46,1
Кверцетин	5	7	-	-	16,3±3,1*	46,7
Ортофен	8	7	16,1±1,2*	54,9	-	-

Примітка: * — вірогідність змін по відношенню до контролю

карагенінового набряку — через 3,0 год за допомогою онкометра. Активність речовин, які досліджувалися, визначали за їх здатністю зменшувати розвиток набряку в порівнянні з контролем і виражали у відсотках, які показують, наскільки ця речовина пригнічує розвиток карагенінового та зимозанового набряків по відношенню до контролю, де величина набряку приймалася за 100% [3].

Вивчення антипроліферативних властивостей проводили на моделі "ватної гранульоми" [3]. У 28 щурів масою 200-230 г, які перебували під ефірним наркозом, на спині депілювали ділянку шкіри і в асептичних умовах ножицями робили поздовжній розріз шкіри і підшкірної клітковини довжиною 1,5 см, формували порожнину, куди вміщували стерильну ватну кульку масою 20 мг; після цього на рану накладали 1-2 шви з шовку. На 8 добу досліду імплантовану кульку з утвореною навколо неї грануляційною тканиною виймали, висушували до постійної ваги і вагу утвореної грануляційно-фіброзної тканини визначали за різницею між масою висушеної гранульоми та імплантованої ватної кульки. Екстракт "Локорин" вводили щоденно в дозі 25 мг/кг і 50 мг/кг, а референс-препарат ортофен — у дозі 8 мг/кг. Були також проведені дослідження кількісного вмісту оксипроліну в сечі щурів [3].

Моделлю для вивчення лікувального ефекту поліфенольного екстракту Лядвенця рогатого на стадію альтерації є відтворення видавлених трафаретних ран [3]. Дослід проводили на 32 білих безпородних щурах масою 200-220 г, яким під наркозом наносили на попередньо депільовану ділянку шкіри спини білатерально до хребта рану у вигляді повношарового дефекту за допомогою металевого пробійника, що має діаметр 1,2 см. Лікування екстрактом "Локорин", який вводили per os в дозах 25 мг/кг та 50 мг/кг, та препаратом порівняння ортофеном в дозі 8 мг/кг починали на 2-й день після відтворення ран. Тварин контрольної групи не лікували. Оцінку репаративних процесів у рані проводили за динамікою планіметричних та гематологічних показників. Планіметричні показники оцінювали на 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 18 та 19 день до повного загоєння ран. У ці строки реєстрували стан рани та вимірювали її площу у $см^2$, прикладаючи до рани прозорий трафарет. Гематологічні дослідження проводили на 5, 9 та 13 день. Про інтенсивність запального процесу на моделі трафаретних ран судили, визначаючи в периферичній крові щурів кількість лейкоцитів та лейкоцитарну формулу за загальноприйнятими в лабораторній практиці методами [3].

Результати експериментів були оброблені за допомогою системи Excel MS Office з використанням методів параметричної і непараметричної (критерій Вілкоксона) статистики [2].

Результати та їх обговорення

Результати вивчення впливу екстракту "Локорин" у дозах 10 і 100 мг/кг (табл. 1) на фазу ексудації показали, що на моделі карагенінового набряку антиексудативної властивості не виявлено. Використання рослинного комплексу "Локорин" у дозі 25 мг/кг приводить до вірогідного зменшення набряку в 1,5 рази; при використанні екстракту в дозі 50 мг/кг — майже в 2 рази в порівнянні з контролем. Його антиексудативна активність у таких дозах складала 40% і 44,5% відповідно, а препарату порівняння ортофену — 54,9%. Це доводить доволі велику активність екстракту, який досліджується.

Введення тваринам екстракту "Локорин" при зимозановому набряку показало, що в усіх дозах вивчаємий екстракт вірогідно зменшував його. Найбільшу активність екстракт "Локорин" виявив у дозах 25 мг/кг та 50 мг/кг (анти-

Таблиця 2

Антипроліферативна активність екстракту "Локорин" на моделі "ватної гранульоми" (n=35)

Група тварин	Доза, мг/кг	Кількість тварин	Маса грануляційної тканини, мг	Антипроліферативна активність, %
Інтакт	-	7	-	-
Контроль	-	7	37,25±2,6	-
Локорин	25	7	27,8±2,4**	25,37
Локорин	50	7	26,4±2,7**	29,13
Ортофен	8	7	29±2,3**	22,15

Примітки:
1) * — вірогідність змін по відношенню до інтакту;
2) ** — вірогідність змін по відношенню до контролю.

ексудативна активність — 56,7% та 59,9% відповідно). Препарат порівняння "Кверцитин" вірогідно зменшував набряк, але його антиексудативна активність була менш вираженою, ніж у екстракту "Локорин" у дозах 25 та 50 мг/кг. Таким чином, аналіз показав, що антиексудативна активність екстракту найбільше проявляється при лікуванні дозами 25 мг/кг та 50 мг/кг при різних моделях набряку, тому саме ці дві дози були обрані для вивчення антипроліферативної та антиальтеративної активності.

Результати дослідження впливу екстракту "Локорин" на проліферативне запалення у дозах 25 мг/кг та 50 мг/кг у порівнянні з референс-препаратом ортофеном представлені у табл. 2. Аналіз даних свідчить про те, що кількість грануляційної тканини вірогідно зменшується під впливом "Локорину" в дозі 50 мг/кг, антипроліферативна активність складає 29,13%. При лікуванні екстрактом "Локорин" у дозі 25 мг/кг та ортофеном у дозі 8 мг/кг антипроліферативна активність була меншою (25,37% та 22,13% відповідно), але вірогідно відрізнялася від значення цього показника в контролі.

Рівень вмісту оксипроліну в сечі відображає, головним чином, ступінь катаболізму колагену сполучної тканини. Як видно з даних табл. 3, через 8 діб після операції по вживленню ватної гранульоми рівень оксипроліну в сечі щурів контрольної групи знижувався майже в 2 рази у порівнянні з групою інтактних тварин, що, можливо, зумовлено накопиченням сполучної тканини у вогнищі запалення. З даних табл. 2 видно, що саме в контрольній групі була найбільша маса грануляційної тканини у порівнянні з іншими групами. При застосуванні лікувального засобу ортофену вміст оксипроліну не зменшувався у порівнянні з контрольною групою, що свідчить про відсутність істотного впливу останнього на розвиток і перебудову грануляційної тканини у вживленій ватній кульці. В той час на тлі введення різних доз комплексу "Локорин" спостерігалося підвищення рівня оксипролінурії, яке корелювало із зростанням дози екстракту. Так, при його застосуванні в дозі 25 мг/кг вміст оксипроліну в сечі складав 15,46 мг/л, а в дозі 50 мг/кг — 25,42 мг/л. Це співпадає з вірогідним зменшенням маси грануляційної тканини саме в цих дослідних групах і свідчить про більшу ефективність рослинного комплексу "Локорин" у дозі 50 мг/кг як засобу, що має антипроліферативну активність.

Таблиця 3

Вміст оксипроліну в сечі щурів на моделі "ватної гранульоми" на тлі введення екстракту "Локорин" (n=35)

Група тварин	Доза, мг/кг	Кількість тварин	Вміст оксипроліну в сечі, мг/л
Інтакт	-	7	21,0±3,3
Контроль	-	7	9,13±2,8*
Локорин	25	7	15,46±1,2*,***
Локорин	50	7	25,42±2,4**,***
Ортофен	8	7	10,98±4,9*,***

Примітки:
1) * — вірогідність змін по відношенню до інтакту;
2) ** — вірогідність змін по відношенню до контролю;
3) *** — вірогідність змін по відношенню до препарату порівняння.

Аналіз табл. 4 показав, що на 5 добу швидкість загоєння трафаретних ран при використанні екстракту "Локорин" у дозі 25 і 50 мг/кг була майже в 3 рази вище, ніж у контролі і в 2 рази вищою у порівнянні з референс-препаратом. На 7 добу площа рани при лікуванні поліфенольним комплексом "Локорин" у дозі 50 мг/кг вірогідно зменшилася в порівнянні з контролем і препаратом порівняння. Цей ефект у даній дозі спостерігався до повного загоєння ран, яке відбувалося між 13 і 15 добою. При його використанні в дозі 25 мг/кг, а ортофену в дозі 8 мг/кг площа рани почала вірогідно зменшуватися на 9 добу лікування в порівнянні з контролем. Повне загоєння ран у цих групах відбувалось між 15 та 18 добою. Аналіз кількості лейкоцитів крові та лейкоцитарної формули як маркерів важкості запалення (табл. 5) дав змогу встановити, що кількість лейкоцитів на 5 день в усіх дослідних групах була майже однаковою, але вірогідно відрізнялась від нелікованого контролю — підвищувалась у 2 рази. На 13 день досліду кількість лейкоцитів була вірогідно вищою тільки при прийомі ортофену та у нелікованих тварин у порівнянні з нормою. В інших групах кількість лейкоци-

Таблиця 4

Вплив екстрактів Лядвенця рогатого на загоєння трафаретних ран у щурів (n=32)

Дні досліду	Контроль		Ортофен, 8 мг/кг		Локорин, 25 мг/кг		Локорин, 50 мг/кг	
	Площа ран, $см^2$	V	Площа ран, $см^2$	V	Площа ран, $см^2$	V	Площа ран, $см^2$	V
2	2,0±0,023		1,95±0,011		2,1±0,05		1,97±0,013	
5	1,7±0,12	0,17	1,55±0,06	0,25	1,4±0,1	0,5	1,25±0,22	0,57
7	1,3±0,05	0,53	1,1±0,004	0,77	1,02±0,011	1,05	0,95±0,07*,**	1,07
9	1,22±0,017	0,63	0,74±0,033*	1,6	0,81±00,55*	1,59	0,7±0,016*	1,81
11	1,05±0,04	0,9	0,6±0,12*	2,25	0,5±0,07*	3,2	0,3±0,003*,**	5,56
13	0,9±0,007	1,2	0,35±0,18*	4,57	0,18±0,063*	10,66	0,15±0,008*,**	12,13
15	0,5±0,0022	3	0,11±0,013*	16,27	0,07±0,00*	29	-	100
18	0,12±0,01	15,6	-	100	-	100	-	100
19	0,08±0,008	24	-	100	-	100	-	100

Примітки:
1) * — вірогідність змін по відношенню до контролю;
2) ** — вірогідність змін по відношенню до препарату порівняння.

Таблиця 5

Вплив екстрактів Лядвенця рогатого на деякі гематологічні показники у щурів на моделі трафаретних ран (n=32)

Строк експерименту	Гематологічні показники	Група тварин				
		інтакт	контроль	ортофен, 8 мг/кг	локорин, 25 мг/кг	локорин, 50 мг/кг
5 доба	лейкоцити, 10^9/л	14,6±1,8	30±3,4*	29,2±2,2*	28,8±1,9*	26,9±1,9*
	паличкоядерні нейтрофіли, %	10,1±0,07	18,6±1,1*	16±2,4*	14,25±3,1*	14,1±2,65*,**
	сегментоядерні нейтрофіли, %	15±1,2	28,5±4,85*	21,6±1,8*,**	23,6±3,3*	20,4±2,75*,**
	лімфоцити, %	71,3±5,1	44,4±7,65*	54,35±4,8*	55,65±6,2*	60,8±4,95*,**
	моноцити, %	3,6±0,55	8,5±0,9*	7±0,15*,**	7,12±0,65*	5,6±0,5*,**
9 доба	лейкоцити, 10^9/л	14,6±1,8	23,8±3,2*	22,8±2,2*	21,4±1,9*	19,5±1,1*
	паличкоядерні нейтрофіли, %	10,1±0,07	12,8±1,7*	10,8±1,4	11±1,5	10,6±0,5**
	сегментоядерні нейтрофіли, %	15±1,2	23,2±2,3*	20,0±0,7*,**	20,2±1,1*	18,7±1,1*,**
	лімфоцити, %	71,3±5,1	56,5±3,66	63,3±5,12	62,5±3,2	65,6±3,55
	моноцити, %	3,6±0,55	7,5±1,5	5,9±0,9	6±0,7	5,1±0,95
13 доба	лейкоцити, 10^9/л	14,6±1,8	19,4±2,4*	17±1,4	16±1**	13,4±1,7**
	паличкоядерні нейтрофіли, %	10,1±0,07	12,5±1,5	10,6±1,1	10,8±1,4	10,4±0,8
	сегментоядерні нейтрофіли, %	15±1,2	21±1,4	17,6±2,07	17,4±0,5	15,2±0,8
	лімфоцити, %	71,3±5,1	62±5,25	67,7±4,1	68±3,6	70,85±4,5
	моноцити, %	3,6±0,55	4,5±0,75	4,2±0,22	3,78±0,5	3,55±0,9

Примітки:
1) * — вірогідність змін по відношенню до інтакту;
2) ** — вірогідність змін по відношенню до контролю.

тів приходила до меж норми. Одержані дані свідчать про те, що поліфенольний екстракт Лядвенця рогатого має виражені протизапальні властивості. Про це свідчить зменшення кількості лейкоцитів та зміна показників лейкоцитарної формули. Зниження кількості паличкоядерних нейтрофілів вже на 5 день у групах тварин, яких лікували екстрактом Лядвенця рогатого, доводить, що перебіг запального процесу стає менш інтенсивним. Збільшення кількості лімфоцитів свідчить про активізацію системи гуморального імунітету, а зменшення кількості моноцитів — про те, що із затуханням запального процесу кількість макрофагів зменшується.

ВИСНОВКИ

1. Екстракт "Локорин" у дозі 50 мг/кг позитивно впливає на перебіг фази ексудації на різних моделях набряку (антиексудативна активність склала при карагеніновому набряку 44,5%, а зимозановому — 59,9%).

2. Екстракт "Локорин" у дозі 50 мг/кг проявляє помірну антипроліферативну активність, яка співпадає з активністю референс-препарату.

3. Екстракт "Локорин" у дозі 50 мг/кг найбільш активно впливає на загоєння трафаретних ран та нормалізує деякі гематологічні показники.

4. Екстракт "Локорин" у дозі 50 мг/кг можна пропонувати для подальшого поглибленого вивчення як протизапального препарату комплексної дії, який активно впливає на всі стадії запалення.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Владимиров Ю.А. //Вестник Рос. АМН 198. — 1998. — №7. — С. 43-51.*
2. *Глянц С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. — М.: Практика, 1998. — 459 с.*
3. *Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекоменд. / За ред. О.В.Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — 528 с.*
4. *Набока О.И., Воронина Л.Н., Ковалев В.Н. и др. //Вісник фармації. — 2002. — №2 (30). — С. 148-149.*
5. *Чекман І.С. //Фітотерапія в Україні. — 2000. — №2. — С. 3-5.*
6. *Bast Alt, Halnen Guido R.M.M., Doclam Cus I.A. //Americ. J. Med. — 1991. — №3. — P. 2-13.*
7. *Chopra M., Fitzimons P.E., Strain J.J. et al. //Clon.Chem. — 2000. — Vol. 46, №8, Pt. 1. — P. 1162-1170.*
8. *Dequeker J., Hawkey C., Kahan A. et al. //Br. J. Rheumatol. — 1998. — Vol. 37. — P. 946-951.*
9. *Erden I.M., Kahraman A. //Toxicology. — 2000. — Vol. 154, №1-3. — P. 21-29.*
10. *Fierro-Carrion G., Ram C.V. //Amer. J. Cardiol. — 1997. — Vol. 80. — P. 775-776.*
11. *Hawkey C., Kahan A., Steinbruck K. et al. //Br. J. Rheumatol. — 1998. — Vol. 37. — P. 937-945.*
12. *Llesuy S.F., Tomaro M.L. //Biochim. et Biophys. Acta. — 1994. — Vol. 1223. — P. 9-14.*
13. *Prast H., Philippu A. //Prog. Neurobiol. — 2001. — Vol. 64. — P. 51-68.*
14. *Stark U., Brodmann M., Luiger A., Stark G. //J. Crit. Care. — 2001. — №1. — P. 8-16.*

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (057) 706-30-99.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 16.02.2005 р.