

Корисна модель належить до фармації і медицини, а саме до засобів, що містять біологічно активні речовини рослинного походження, зокрема до способу одержання засобу з протизапальною дією на основі соку плодів ожини.

Запальні захворювання, включаючи різні види ревматичних захворювань, є серйозною проблемою охорони здоров'я у всьому світі. Запалення - це захисна реакція організму на вплив бактерій, вірусів, паразитів, а також негативних зовнішніх факторів (температура, радіація, вплив хімічних сполук [1]. На сьогодні, згідно з клінічними протоколами лікування використовують нестероїдні протизапальні препарати (НПВП) та стероїдні препарати, які призводять до серйозних побічних ефектів. НПВП інгібують ранні етапи біосинтезу простагландинів через інгібування циклооксигенази 2 (ЦОГ-2). НПВП є важливими препаратами, які використовуються для зменшення небажаних наслідків запалення. Але, довготривале застосування НПВП пов'язане з серцево-судинною, шлунково-кишковою та нирковою токсичністю. Так само використання кортикостероїдів призводить до гіпертонії, гіперглікемії, остеопорозу [2]. Токсичність і рецидив симптомів при припиненні прийому є серйозною проблемою, пов'язаною з наявними наразі синтетичними препаратами. Таким чином, розробка більш безпечних протизапальних засобів залишається актуальною до цього часу.

Розробка протизапальних препаратів, отриманих з природних сполук, є раціональною стратегією лікування запальних захворювань. Фітопрепарати є безпечними, ефективними, біосумісними та економічно вигідними альтернативами лікуванню запальних захворювань. Протизапальна дія фітокомпонентів здійснюється за рахунок їх впливу на ключові регуляторні молекули, включаючи ЦОГ-2, цитокіни, ядерний фактор κB (Nf- κB), фосфоліпазу A2, 5-ліпооксигеназу (5-ЛОГ) та окислювальний стрес [3].

Відомий спосіб отримання поліфенольного комплексу "Флавітин" з протизапальною, анальгетичною, противиразковою та антиоксидантною активністю з листя винограду сорту Дабуш [4], що включає екстракцію сировини 50 % спиртом етиловим, при співвідношенні сировина екстрагент 1:10 з подальшим упарюванням, фільтрацією, ресорбцією фенольних сполук з осаду водою, упарюванням і сушінням.

До недоліків відомого способу можна віднести однократну екстракцію, яка не дозволяє досягнути максимального витягу із сировини поліфенольних сполук.

Існує спосіб отримання комплексу біологічно активних речовин у формі сухого екстракту з противиразковою, протизапальною та мембраностабілізуючою дією з листя ліщини звичайної або грабу звичайного [5] шляхом триразовою екстракцією водою за температури 50-60 °C при співвідношенні сировини до екстрагенту 1:10-1:15 протягом 4-5 годин.

До недоліків відомого способу можна віднести тривалість процесу та недостатню антиоксидантну дію засобу.

Відомий спосіб одержання засобу з протизапальною та антиоксидантною дією [6], що включає екстракцію листя абрикоса звичайного гарячою водою при співвідношенні 1:10-1:11 протягом 30 хвилин, фільтрують витяги, упарюють об'єднані витяги під вакуумом до співвідношення 1:1.

До недоліків за прототипом можна віднести використання води, як екстрагенту, оскільки при даній екстракції екстрагується полісахариди, які не мають антиоксидантну дію, а лише збільшують масу сухого залишку екстракту, також при екстракції водою не екстрагується більша частка флавоноїдів.

Задача корисної моделі є розробка способу одержання засобу з протизапальною дією на основі соку плодів ожини.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі одержання засобу з протизапальною дією на основі соку плодів ожини, що включає що включає фільтрування і упарювання рослинної сировини, згідно з корисною моделлю, як рослинну сировину використовують плоди ожини, сировину пресують, додають 96 % етанол у трикратній кількості до витягу, фільтрують, концентрують фільтрат у вакуум-випарному апараті за температури 50-60 °C до вологості екстракту 25 %. Під умовною назвою "Рубіфен"

Приклад 1.

100 г плодів ожини пресували, до одержаного витягу 80 г додавали 240 г 96 % етанолу, фільтрували, концентрували фільтрат у вакуум-випарному апараті при температурі 50-60 °C до вологості екстракту 25 %.

Приклад 2.

Для теоретичної оцінки протизапальної активності екстракту було використано метод молекулярного докінгу. Для проведення цього дослідження було використано комп'ютерну програму Autodock 4.2 MGL Tools. Для дослідження протизапальної активності були обрані ряд ферментів - ЦОГ-2 (PDB ID: 1ddx), Nf- κB (PDB ID: 1svc), фосфоліпаза A2 (PDB ID: 3hsw), 5-ЛОГ (PDB ID: 2q7m) дані структури ферментів були взяті з банку даних білка (БДБ) [7]. За допомогою Computed Atlas for Surface Topography of Proteins [8] були визначені амінокислоти в активному центрі ферменту відповідних за його інгібування. Для дослідження було взято ціанідин-3-О-глюкозид (CID_12303220), оскільки дана сполука є головними у складі засобу, як стандарт, у протизапальної активності - диклофенак натрію (CID_5018304), 3D - структура даних сполук були взяті з PubChem [9].

Комп'ютерною програмою Autodock 4.2 MGL Tools була використана для оптимізації структури ферментів шляхом видалення води, зайвих атомів, і додавання водневих груп. Потім AutoGrid визначило нативне розташування ліганду для зв'язування з активним центром ферменту шляхом розташування координати сітки (X, Y і Z). Зв'язування ліганду з ферментом проводили шляхом регулювання параметрів генетичного алгоритму (ГА), використовуючи 10 запусків критеріїв ГА. Для оцінки ефективності рівня зв'язування були використані наступні показники E (Енергія зв'язку, ккал/моль) і IC50, (концентрація речовини, яка інгібує 50 % ферменту, ммоль). У випадку показника E, чим менше значення, тим краще зв'язок між лігандом і ферментом.

Результати дослідження представлені у таблиці 1.

Таблиця 1

Результати дослідження молекулярного докінгу протизапальної активності ціанідину-3-О-глюкозиду за ферментом ЦОГ-2, Nf-kB, 5-ЛОГ, фосфоліпаза A2

	ЦОГ-2		Nf-kB		5-ЛОГ		Фосфоліпаза A2	
	E, ккал/М	IC ₅₀ , мм	E, ккал/М	IC ₅₀ , мм	E, ккал/М	IC ₅₀ , мм	E, ккал/М	IC ₅₀ , мм
Диклофенак натрію	-5,76	0,05977	-3,90	1,38	-6,00	0,03982	-7,65	0,00248
Ціанідин-3-О-глікозид	-10,85	0,0000112	-5,38	0,1148	-8,65	0,000458	-11,52	0,0000036

Приклад 2.

Протизапальна активність засобу Рубіфен була вивчена на 30 білих безпородних щурів-самців масою 180-220 г, на яких була створена модель гострого запалення, індукованого субплантарною ін'єкцією 0,1 мл 1 % карагану (Fluka, Швейцарія) у праву задню лапу щурів. Вимірювання набряку лапи у щурів проводили через 1, 2, 3, 4 години з урахуванням того, що після введення максимальний набряк карагану спостерігається до третьої години, потім набряк поступово зменшується протягом дня [10]. Для цього обсяг лап см³ вимірювали за допомогою цифрового плетизмометра Panlab (Іспанія) моделі LE 7500 версії V29/10/2014. Величина набряку в кожному у випадку визначалася різницею в обсязі між набряклими та здоровими лапами і виражалася %, показуючи, наскільки досліджуваний препарат пригнічує розвиток набряку порівняно з контролем, де величина набряку приймалася як 100 %. Антиексудативна активність екстракту та препарату порівняння розраховували за формулою:

$$A = \frac{(M_s - M_h) \times 100}{M_{sh} - M_{hc}}, (1)$$

де A - антиексудатна активність, %; M_s - об'єм набряклої лапи в досліді; M_h - об'єм здорової лапи в досліді; M_{sh} - об'єм набряклої лапи в контролі; M_{hc} - об'єм здорової лапи в контролі.

Усі тварини були розділені на 5 груп. Перша група - контрольна патологія (тваринам субплантарно вводили розчин карагану, а всередину шлунка - 0,5 мл/кг дистильованої води). Друга, третя і четверта групи - тваринам під шкіру вводили розчин карагану, і вивчений засіб - всередину шлунка в дозі 15,0 мг/кг, 30,0 мг/кг, 60,0 мг/кг, відповідно. Тваринам 5-ї групи на тлі введення карагану внутрішньошлунково вводили препарати порівняння: диклофенак натрію в дозі 8 мг/кг.

Результати вивчення протизапальної активності засобу, одержаного за заявленим способом, наведені у таблиці 2.

Таблиця 2

Вплив досліджуваного засобу на процес ексудації при запаленні карагану у щурів (M ± m, n=8, p < 0,05)

Досліджуваний зразок	Доза, мг/кг	% інгібування набряку порівняно з контролем продовж часу			
		1 година	2 година	3 година	4 година
Рубіфен	15,0	60,0* ±0,6	25,0* ±0,3	0,0	0,0
Рубіфен	30,0	110,0* ±1,0	36,0* ±0,37	5,0* ±0,05	10,0* ±0,05
Рубіфен	60,0	118,0* ±1,8	103,0* ±1,0	82,0* ±0,8	69,0* ±0,7
Диклофенак натрію	8,0	58,0	38,0	35,0	37,0

		±2,9	±1,9	±1,9	±1,9
--	--	------	------	------	------

Примітки:

* - рівень статистичної значущості щодо групи препарату порівняння диклофенак натрію;

Відповідно до отриманих теоретичних результатів у дослідження молекулярного докінгу протизапальної активності ціанідину-3-О-глікозиду з активним центром ЦОГ-2, було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідин-3-глюкозиду був вище на 50 %, ніж у стандарті порівняння диклофенаку натрію, відповідно. При теоретичному дослідженні інгібування ферменту Nf-kB було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-глікозиду вище на 35 % ніж у стандарті порівняння диклофенаку натрію, відповідно.

При молекулярному докінгу ціанідину-3-О-глікозиду з активним центром 5-ЛОГ було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-глікозиду був вище на 40 %, ніж у стандарті порівняння диклофенаку натрію, відповідно. У Таблиці 1 показано, що при теоретичному дослідженні інгібування ферменту фосфоліпаза A2 було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-глікозиду був вище на 40 %, ніж у стандарті порівняння диклофенаку натрію.

"Рубіфен" у дозі 60,0 мг/кг значно зменшив набряк лапи на 118 % порівняно з контрольною групою вже з першої години. Надалі набряк лапи зменшився на 103,0, 82,0 та 69,0 % через 2, 3 та 4 години, відповідно порівняно з контрольною групою. Рівень протиексудативної активності "Рубіфену" у дозі 30,0 мг/кг був достовірно ($p>0,05$) нижче порівняно з прийомом дози " Рубіфену " 60,0 мг/кг. Застосування " Рубіфену " у дозі 60,0 мг/кг показало значне зменшення набряку через 1, 2, 3 та 4 години порівняно з препаратом порівняння диклофенак натрію. (Таблиця 2)

Таким чином, заявлений спосіб одержання засобу з протизапальною дією на основі соку плодів ожини, відзначається рядом переваг:

- 1) простота та можливість проведення на стандартному обладнанні у промислових умовах України;
- 2) вітчизняна сировина;
- 3) наявність вираженої протизапальної активності соку плодів ожини, одержаного за заявленим способом;
- 4) перспективність використання одержаного соку як лікарської субстанції для одержання різних лікарських форм.

Джерела інформації.

1. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals / K. R. Patil et al. International Journal of Molecular Sciences. - 2019. - Vol. 20, no. 18. - P. 4367. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20184367> (date of access: 03.02.2024).

2. Natural medicines of targeted rheumatoid arthritis and its action mechanism / X. Liu et al. Frontiers in Immunology. - 2022. - Vol. 13. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.945129> (date of access: 03.02.2024).

3. The Update Immune-Regulatory Role of Pro-and Anti-Inflammatory Cytokines in Recurrent Pregnancy Losses / X. Yang et al. International Journal of Molecular Sciences. - 2022. - Vol. 24, no. 1. - P. 132. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms24010132> (date of access: 03.02.2024).

4. Спосіб одержання поліфенольного комплексу "Флавітин" з протизапальною, анальгетичною, противиразковою та антиоксидантною активністю: пат. 59681 А Україна: А61К 36/87, А61К 127/00, С11В 1/10, А61Р 29/00, А61Р 39/06. № 2002119121; заявл. 15.11.2002; опубл. 15.09.2003, Бюл. № 9. 8 с.

5. Спосіб одержання комплексу біологічно активних речовин з антиоксидантною та протизапальною дією: пат. 86502 Україна: А61К 36/899, А61К 127/00, А61Р 7/10, А61Р 11/02, А61Р 17/08, А61Р 39/06. № а200708446; заявл. 23.07.2007; опубл. 27.04.2009, Бюл. № 8. 8 с.

6. Спосіб одержання засобу з протизапальною та антиоксидантною дією: пат. 41772 Україна: А61К 36/736. № u2008114477; заявл. 15.12.2008; опубл. 10.06.2009, Бюл. № 11. 8 с.

7. RCSB PDB: Homepage. RCSB PDB: Homepage. URL: <https://www.rcsb.org/> (date of access: 22.01.2022).

8. CASTp 3.0: Computed Atlas of Surface Topography of proteins. URL: <http://sts.bioe.uic.edu/castp/index.html?2011> (date of access: 22.01.2022).

9. PubChem. PubChem. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (date of access: 22.01.2022).

10. Доклинические исследования лекарственных средств: метод. руководство: навч. посіб. / ред. О.В. Стефанов. - К.: Вид. дом "Авиц.", 2001. - 528 с.