

Корисна модель належить до фармації і медицини, а саме стосується засобів, що містять біологічні активні речовини рослинного походження, зокрема - способу одержання протизапального засобу з екстрактом плодів брусниці.

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 здійснюють 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].

Брусниця (*Vaccinium vitis-idaea* L.) - вічнозелений чагарник родини вересових (Ericaceae). Ареал поширення - Росія, країни Балтії, північні регіони України та Білорусі, а також Канада [4]. Хімічний склад плодів *V. vitis-idaea* представлений антоціанами (ціанідин-3-О-галактозид) та органічними кислотами (лимонна кислота) [5].

Відомий спосіб отримання поліфенольного комплексу "Флавітин" з протизапальною, анальгетичною, противиразковою та антиоксидантною активністю з листя винограду сорту Дабуш [6], 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 одержання комплексу біологічно активних речовин у формі сухого екстракту з противиразковою, протизапальною та мембраностабілізуючою дією з листя ліщини звичайної або граба звичайного [7] шляхом триразової екстракції водою за температури 50-60 °C при співвідношенні сировини і екстрагенту (1:10)-(1:15), протягом 4-5 годин.

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

Відомий спосіб одержання засобу з протизапальною та антиоксидантною дією [8], що включає екстракцію листя абрикоса звичайного гарячою водою при співвідношенні 1:10-1:11, протягом 30 хвилин, фільтрують витяжки, упарюють об'єднані витяжки під вакуумом до співвідношення 1:1.

До недоліків відомого аналога можна віднести використання води як екстрагента, оскільки при даній екстракції екстрагують полісахариди, які не мають антиоксидантної дії, а лише збільшують масу сухого залишку екстракту, також при екстракції водою не екстрагують більшу частку флавоноїдів.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб одержання протизапального засобу з екстрактом плодів брусниці.

Поставлена задача вирішується за способом одержання протизапального засобу з екстрактом плодів брусниці, що включає екстракцію рослинної сировини, згідно з корисною моделлю як рослину сировину використовують плоди брусниці звичайної, сировину пресують, додають 96 % етанол у трикратній кількості до витяжки, фільтрують, концентрують фільтрат у вакуум-випарному апараті при температурі 50-60 °C до вологості екстракту 25 %.

В одержаному екстракті з плодів брусниці містять наступні фенольні сполуки: похідні антоціанів, флавоноїдів, гідроксикоричних та органічних кислот.

Корисну модель ілюструють прикладами:

Приклад 1

100 г плодів брусниці пресували, до одержаної витяжки 80 г додавали 240 г 96 % етанолу, фільтрували, концентрували фільтрат у вакуум-випарному апараті за температури 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 вибрані ряд ферментів -

ЦОГ-2 (PDB ID: 1ddx), Nf-kB (PDB ID: 1svc), фосфоліпаза A2 (PDB ID: 3hsw), 5-ЛОГ (PDB ID: 2q7m) дані структури ферментів були взяті з банку даних білка (БДБ) [9]. За допомогою Computed Atlas for Surface Topography of Proteins [10] були визначені амінокислоти в активному центрі ферменту відповідних за його інгібування. Для дослідження було взято ціанідин-3-О-галактозид (CID_ 441699), ціанідин-3-О-глікозид (CID_12303220), оскільки дані сполуки є головними у складі екстракту, як стандарт протизапальної активності було вибрано диклофенак натрію (CID_5018304), 3D-структура даних сполук були взяті з PubChem [11]. 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-галактозиду, ціанідину-3-О-глікозиду 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-галактозид	-11,11	0,0000071	-5,79	0,05682	-9,34	0,00014	-10,45	0,000022
Ціанідин-3-О-глікозид	-10,85	0,0000112	-5,38	0,1148	-8,65	0,00046	-11,52	0,0000036

Приклад 3

Протизапальна активність екстракту плодів брусниці була вивчена на 32 білих безпородних щурів-самців масою 180-220 г, на яких була створена модель гострого запалення, індукованого субплантарною ін'єкцією 0,1 мл 1 % карагінану (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 карагінану спостерігається до третьої години, потім набряк поступово зменшується протягом дня [12]. 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 плодів брусниці та препарату порівняння розраховували за формулою:

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

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 4 груп. Перша група - контрольна патологія (тваринам субплантарно вводили розчин карагінану, а всередину шлунка - 0,5 мл/кг дистильованої води). Друга, третя і четверта групи - тваринам під шкіру вводили розчин карагінану, а вивчений екстракт - всередину шлунка в дозі 6,5 мг/кг, 13,0 мг/кг, відповідно. Тваринам 5-ї групи на тлі введення карагінану внутрішньошлунково вводили препарати порівняння: диклофенак натрію в дозі 8 мг/кг; 6-ю групу складали інтактні тварини, тваринам під шкіру вводили по 0,1 мл фізіологічного розчину.

Результати дослідження представлені у таблиці 2.

Вплив досліджуваного екстракту
на процес ексудації при запаленні карагану у щурів ($M \pm m$, $n=8$, $p<0,05$)

Експериментальні умови	Доза, мг/кг	Параметр	Динаміка розвитку запалення, години			
			1	2	3	4
Контрольна патологія (КП)		ΔV	0,47 $\pm 0,05$	0,84 $\pm 0,08$	1,10 $\pm 0,11$	1,16 $\pm 0,12$
Екстракт плодів брусниці	13,0	ΔV	0,28*/** $\pm 0,02$	0,43*/** $\pm 0,03$	0,93*/** $\pm 0,04$	1,03*/** $\pm 0,02$
		AA, %	40,6	49,4	15,6	10,9
Екстракт плодів брусниці	6,5	ΔV	0,35*/** $\pm 0,04$	0,64*/** $\pm 0,08$	0,98*/** $\pm 0,07$	1,08*/** $\pm 0,05$
		AA, %	25,6	23,3	10,7	7,0
Диклофенак натрію	8	ΔV	0,20* $\pm 0,02$	0,52* $\pm 0,05$	0,71* $\pm 0,08$	0,73* $\pm 0,07$
		AA, %	58,0	38,0	35,0	37,0

Примітки:

- 1* $p \leq 0,05$ - рівень статистичної значущості групи КП;
2. ** $p \leq 0,05$ - достовірні значення для препарату порівняння диклофенак натрію;
3. AA - антиексудативна активність;
4. ΔV - розмір набряку;
5. n - кількість тварин у групі.

Згідно до отриманих теоретичних результатів у дослідження молекулярного докінга протизапальної активності ціанідину-3-О-галактозиду, ціанідину-3-О-глікозиду з активним центром ЦОГ-2, було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідину-3-О-глікозиду був вище на 47 % та 46 %, ніж у стандарта порівняння диклофенаку натрію, відповідно. (Таблиця 1)

При теоретичному дослідженні інгібування фермента Nf-kB було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідину-3-О-глікозиду був вище на 35 % та 34 %, ніж у стандарті порівняння диклофенаку натрію, відповідно. (Таблиця 1)

При молекулярному докінгу ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідину-3-О-глікозиду з активним центром 5-ЛОГ було встановлено, що рівень енергії зв'язку був вище на 38 % та 37 %, ніж у стандарті порівняння диклофенаку натрію, відповідно. (Таблиця 1)

У Таблиці 1 показано, що при теоретичному дослідженні інгібування фермента фосфоліпаза A2 було встановлено, що рівень енергії зв'язку ціанідину-3-О-галактозиду та ціанідину-3-О-глікозиду був вище на 22 % та 19 %, ніж у стандарті порівняння диклофенаку натрію, відповідно. Таким чином, у ході теоретичного дослідження встановлено, що ціанідин-3-О-галактозид та ціанідин-3-О-глікозид мають протизапальну дію.

Екстракт плодів брусниці у дозі 13,0 мг/кг значно зменшив запалення лапи на 40,6 % порівняно з контрольною групою вже з першої року. Після цього лапи зменшилися на 49,4, 15,6 та 10,9 % через 2, 3 та 4 години відповідно до контрольної групи. Лікування екстрактом плодів брусниці показало значне зменшення захворювання через 2 години, ніж препаратом порівняння диклофенаком натрію. (Таблиця 2)

Таким чином, запропонований спосіб одержання засобу з одержання протизапального засобу з екстрактом плодів брусниці, відзначають ряд переваг:

- 1) простота та можливість проведення на стандартному обладнанні у промислових умовах України;
- 2) наявність вираженої протизапальної активності екстракту з плодів брусниці, одержаного за запропонованим способом;
- 3) перспективність використання одержаного екстракту 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. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24010132> (date of access: 03.02.2024).
4. The study of the qualitative composition and the quantitative content of phenolic compounds in dietary supplements with lingonberry / O. Y. Maslov et al. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*. 2021. Vol. 19, no. 4(76). P. 40-46. DOI: <https://doi.org/10.24959/ophcj.21.243782> (date of access: 03.12.2025).
5. Chemical Composition and Biological Activities of the Nord-West Romanian Wild Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Leaves / B.-E. Ștefănescu et al. *Antioxidants*. 2020. Vol. 9, no. 6. P. 495. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9060495> (date of access: 03.12.2025).
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. RCSB PDB: Homepage. RCSB PDB: Homepage. URL: <https://www.rcsb.org/> (date of access: 22.01.2022).
10. 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).
11. PubChem. PubChem. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (date of access: 22.01.2022).
12. Доклинические исследования лекарственных средств: метод. руководство: навч. посіб. / ред. О. В. Стефанов. Киев: Вид. дом "Авиц.", 2001. 528 с.