

Корисна модель належить до галузей фармацевтичної промисловості та медицини, зокрема до способів одержання біологічно активних речовин рослинного походження для створення лікарських засобів з вираженою нейротропною дією. Розробка стосується способу одержання сухого водного екстрактів з листя зніту шорсткого (*Epilobium hirsutum* L.).

Рід *Epilobium* Dill, ex L. s. 1. - один із найбагатших на види родів родини Onagraceae Juss., що налічує близько 180-200 видів [1] і має довгу історію використання в традиційній медицині Європи, Азії та Північної Америки. У європейській фітотерапії найчастіше використовують надземні частини, або листя та квіти зніту вузьколистого, зніту дрібноквіткого та зніту шорсткого, які вживають як трав'яні чаї для лікування захворювання простати та сечовивідних шляхів, доброякісна гіперплазія передміхурової залози та шлунково-кишкові проблеми [2, 3]. В Україні найбільш поширеними у природі є зніт вузьколистий та зніт шорсткий [4, 5].

За літературними даними, рослини роду *Epilobium*, а саме *E. angustifolium* та *E. hirsutum*, містять фенольні сполуки, включно з еллаговою, галовою та хлорогеновою кислотами, а також флавоноїдами (авікулярин, гіперозид, міріцетином, кемпферолом і кверцетином), та циклічними димерними еллагатанінами (наприклад, оенотейном В) [6-8], що забезпечують протимікробну, протизапальну, антиоксидантну та противірусну активність, підтверджений експериментально *in vitro* та *in vivo* [8-10].

Згідно з літературними даними, для екстракції фенольних сполук з листя зніту або епілобіуму застосовують як водні, так і органічні (етилацетат, етанол, метанол, ацетон) розчинники [9, 11, 12], причому екстракцію проводять впродовж 24 годин при кімнатній температурі. Полярні спиртові суміші (етанол 50-70 % або метанол 50-80 %) часто демонструють високу ефективність вилучення широкого спектра фенольних й флавоноїдних сполук, у тому числі менш полярних компонентів, та забезпечують високий коефіцієнт вилучення при термічних або ультразвукових процедурах [13, 14]. Недоліками даних розчинників є їх токсичність, вибіркова селективність під конкретні класи речовин, втрата полярних речовин, сприяння утворенню артефактів при тривалому процесі екстракції [15].

Водночас водні екстракти забезпечують селективне вилучення більш полярних фенольних компонентів (фенольні кислоти, флавоноїди, таніни, тощо), нетоксичні та безпечніші з точки зору біомедичного застосування (відсутність залишкових органічних розчинників), а також простіші у масштабуванні для фармацевтичного/харчового використання [16-18]. Водна екстракція забезпечує фармакологічно релевантні екстракти, які краще відображають традиційне використання (відвари, настої, чаї) та потенційний вплив *in vivo* [19]. Таким чином, використання води як екстрагента забезпечує одержання екологічно безпечного, нетоксичного екстракту, придатного для подальшого фармакологічного застосування [20]. Фенольні сполуки зніту та епілобіуму добре розчиняються у воді, що зумовлює доцільність вибору саме водного середовища для екстракції в умовах ультразвукової активації.

Водні екстракти з сировини зніту вузьколистого проявили виражені антипроліферативні ефекти, знижуючи проліферацію клітин простати *in vivo* та зниження частоти розвитку аденоми простати у щурів *in vivo* [21]; водні екстракти зніту шорсткого виявили антивірусну активність проти SARS-CoV-2 та виражені протизапальні ефекти *in vitro* [8]; крім того водні екстракти зніту шорсткого *in vivo* показують вплив на печінкові шляхи метаболізму, змінюючи експресію ключових ферментів CYP24A1 та CYP27B1 у печінці щурів [22]; також водні екстракти зніту шорсткого виявляють антибактеріальну та протигрибкову активність [23]. Незважаючи на широкий спектр встановлених дій для водних екстрактів, дані щодо оцінки нейротропної активності відсутні.

Патенти, що стосуються нейротропної активності для екстрактів з рослин роду *Epilobium*, у патентних базах відсутні. Водночас існує кілька експериментальних публікацій присвячених дослідженню загальних екстрактів та їх впливу на нейрональні маркери й ензими.

Екстракти зніту вузьколистого (70 % метанольний та водний) індукують активність

нейтральної ендопептидази та інгібують клітинну проліферацію в модельних клітинних лініях, що може опосередковано свідчити про їхній потенційний вплив на метаболізм пептидів у нервовій тканині [25].

Ідентифіковано інгібування нейтральних металопротеїназ (NEP, ACE, APN) флавоноїдами та еллагітанінами з 70 % метанольного, етилацетатного, бутанольного екстрактів з надземної частини з зніту вузьколистого, що може мати значення для регуляції метаболізму сигнальних пептидів [26]. Екстракт з листя епілобіум шорсткого, що одержано підкисленим етанолом (80 % етанолу, 19 % H_2O та 1 % 0,1 % трифтороцтової кислоти) з екстракцією впродовж двох годин, продемонстрував протиконвульсивну дію [24]. Однак зазначений спосіб одержання відрізняється використанням токсичних розчинників. Наведені публікації можна розглядати, як найближчі аналоги, однак вони не забезпечують прямого підтвердження нейротропної дії рослини.

Задача корисної моделі полягає у використанні надземної частини зніту шорсткого, заготовленої на території України, що забезпечує специфічний якісний та кількісний склад фенольних сполук і еллаготанінів у водному екстракті. Отриманий за даним способом екстракт характеризуються стабільним якісним складом, підтвердженням методом вискоєфективної тонкошарової хроматографії, та високим загальним вмістом фенольних сполук, визначеним спектрофотометричним методом (реакція з реактивом Фоліна-Чокальтао). Фармакологічні дослідження встановили нейротропну дію у здорових тварин.

Поставлена задача вирішується таким чином, що за способом одержання екстракту з зніту шорсткого з нейротропною дією, що включає багаторазову екстракцію рослинної сировини, фільтрацію, очищення, упарювання, ліофілізацію, який відрізняється тим, що як рослинну сировину використовують листя зніту шорсткого, екстракцію проводять на ультразвуковій бані при 30-40 °C тричі водою очищеною у співвідношенні сировини і екстрагенту 1:10 впродовж 60 хвилин, очищення проводять шляхом фільтрації та відокремлення надосадової рідини, яку піддають концентруванню у вакуум-випарному апараті при температурі 40 °C до співвідношення кількості екстракту і сировини 1:2, з наступною ліофілізацією при -20 °C до одержання сухого екстракту.

Запропонований спосіб забезпечує вихід сухого екстракту з листя зніту шорсткого, що становить 5,27 % та вміст загальних фенольних сполук у сухому екстракті 22,77 мг ГА-екв./г; одержаний екстракт містить гідроксикоричні кислоти - хлорогенову кислоту, галову кислоту, та флавоноїди - авікулярин, гуаяверин, ізокверцитрин та гіперозид, як маркерні компоненти.

Корисна модель ілюструється прикладами.

Приклад 1

100 г висушеного листя зніту шорсткого, подрібненого до розміру часток 2-3 мм, поміщали в окремі колби, додавали по 1 л дистильованої води (співвідношення сировина:розчинник 1:10). Екстрагування проводили на ультразвуковій бані при температурі 30-40 °C протягом 60 хвилин. Екстракцію повторювали двічі з новими порціями екстрагенту (1 л). Одержані витяжки об'єднували та фільтрували через паперовий фільтр для видалення твердої фази (рослинної сировини). Фільтрати упарювали до густого залишку за допомогою ротаційного вакуум-випарного апарата до об'єму 200 мл при 40 °C під зменшеним тиском. Отримані густі екстракти поміщали у холодильник з подальшою ліофілізацією при температурі -20 °C для отримання сухих екстрактів.

В результаті, заявленим способом було одержано сухий екстракт темно-коричневого кольору. Вихід сухого екстракту з листя зніту шорсткого становив: отримано 5,27 г сухого екстракту (вихід 5,27 % w/w).

Приклад 2

Досліджували якісний аналіз фенольних сполук методом вискоєфективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ аналіз)

Аналіз проводили на системі CAMAG, що включала напівавтоматичний семплер Linomat

5, автоматичну камеру розвитку ADC2, нагрівач для планшетів TLC III та візуалізатор TLC з програмним забезпеченням visionCATS 3.1. Як стаціонарну фазу використовували пластини Silica gel 60 F254 (Merck KGaA, Darmstadt, Німеччина) розміром 20×10 см, товщина шару 0,20 мм. Зразки наносили за допомогою шприца Camag (100 мкл) у вигляді смуг шириною 8 мм, відстань від лівого краю - 15 мм, від нижнього - 10 мм, відстань між треками - 10 мм, під потоком азоту.

0,5 мг сухого екстракту зважували та розчиняли у 5,0 мл метанолу. Для повного розчинення речовин, екстракцію проводили на ультразвуковій бані при температурі 30-40 °C протягом 15 хвилин. Розчини фільтрували через нітрильний мембранний фільтр (0,45 мкм) і використовували для аналізу.

Процес хроматографування проводили у камері, що була попередньо насичена протягом 20 хвилин при кімнатній температурі, рухливою фазою: етилацетат - мурашина кислота - вода 68:8:8 (v/v). Відстань, що проходить розчинник - 70 мм.

Після проходження, пластини сушили під теплим повітрям, обробляли реагентом Natural Product A (2-Aminoethyl-diphenylborinat, CAS-No.: 524-95-8) (2 г 2-амінетил-дифенілборату у 200 мл метанолу), потім у PEG400 (polyethylene glycol 400, CAS No.: 25322-68-3) (10 г поліетиленгліколю 400 у 200 мл дихлорометану) за допомогою пристрою для занурення хроматограми CAMAG і прогрівали на 5 хв при 100 °C.

Візуалізацію забарвлення зон та їх локалізацію проводили під білим світлом, UV 254 та 366 нм, фотографували та завантажували у програмне забезпечення VisionCats для подальшого аналізу.

Результати вивчення профілю фенольних сполук сухого екстракту зніту шорсткого, що одержано заявленим способом, наведені на кресленні.

Аналіз ВЕТШХ показав наявність хлорогенової кислоти (chlorogenic acid, CAS No.: 327-97-9), авікулярина (avicularin, CAS No.: 572-30-5), гуаяверина (guaiaverin, CAS No.: 22255-13-6), ізокверцитрина (isoquercitrin, CAS No.: 482-35-9) та гіперозида (hyperoside, CAS No.: 482-36-0) у сухому водному екстракті зніту шорсткого. Речовин проявлялись у вигляді жовтих флуоресцентних зони ($R_f=0,42$; $R_f=0,40$; $R_f=0,85$; $R_f=0,52$), що відповідали ізокверцитрину, гіперозиду, авікулярину та гуаяверину, і ці сполуки домінували в екстракті. Світло-блакитна флуоресцентна зона ($R_f=0,73$) була ідентифікована як галова кислота (gallic acid, CAS No.: 149-91-7), а інтенсивна голуба зона ($R_f=0,27$) ідентифікована як хлорогенова кислота. Приклад 3 Дослідження загального кількісного вмісту фенольних сполук.

Принцип дослідження полягає у реакції відновлення реактиву Фоліна-Чокальтеу (Folin-Ciocalteu reagent, CAS No. 12111-13-6) під дією фенольних сполук дає кольоровий комплекс, інтенсивність якого пропорційна загальному вмісту окислювальних фенолів; вимірювання здійснюють спектрофотометрично при 765 нм. Результат виражають у мг еквівалента галової кислоти (ГА-екв.) на г сухої сировини або на г сухого екстракту.

Наважку сухого екстракту (10 мг) розчиняли у 50 % (v/v) метанолі у співвідношенні 1:10 для отримання дослідного розчину. Далі 0,2 мл екстракту змішували з 0,2 мл реагенту Фоліна-Чокальтеу, 1,8 мл дистильованої води та 2 мл 7 % розчину карбонату натрію (Na_2CO_3). Об'єм розчину доводили водою до необхідного об'єму та витримували в темному місці протягом 90 хв.

Оптичну густину розчину вимірювали при $\lambda=750$ нм на спектрофотометрі Halo DB-20 (Dynamica Halo DB-20; Livingston, UK).

Для побудови калібрувальної кривої використовували галову кислоту, результати виражали як еквівалент галової кислоти (mg GAE/g), а вміст сполук перераховували на 1 г сухої рослинної сировини.

Отримані дані розраховували за допомогою рівняння лінійної регресії калібрувального графіка галової кислоти: $y=3.854x-0.0295$; $R^2=0.9999$, де y - інтенсивність поглинання, x - загальна кількість фенольних сполук, виражена як еквівалент галової кислоти на грам сухої речовини (мг ГА/г екстракту). Розрахунок загального вмісту фенольних сполук у сухому

екстракти проводять за формулою:

$$C_{\text{екстракт}} = \frac{C_{\text{сировина}} \times m_{\text{сировина}}}{m_{\text{екстракт}}}.$$

$C_{\text{сировина}}$ - вміст фенольних речовин у сировині (мг ГА-екв./г сухої сировини) (1,55 мг/г для сировини зніту шорсткого).

$m_{\text{наважки}}$ - маса наважки сировини, г (100 г).

$m_{\text{екстракт}}$ - маса отриманого сухого екстракту, г (6,3 г для зніту шорсткого).

Кількісний вміст фенольних сполук у сухому екстракті зніту шорсткого становить: 22,77 мг.

Приклад 4

Дослідження нейротропної дії сухого водного екстракту зніту шорсткого *in vivo*.

Для проведення експериментальних досліджень використовували 108 статевозрілих самців щурів лінії Wistar масою 190-210 г, отриманих із віварію Національного фармацевтичного університету (НФаУ). Тварин утримували у стандартних клітках за умов контрольованого мікроклімату: температура повітря становила 22 ± 1 °C, відносна вологість - у межах норми, світловий режим - чергування світлової та темної фаз (12:12 год). Тварини мали вільний доступ до стандартного корму для лабораторних гризунів та води очищеної. Усі експерименти проводили відповідно до вимог Директиви Європейського Союзу 2010/63/EU "Про захист тварин, що використовуються для наукових цілей" [27].

Тварин розподіляли випадковим чином на три експериментальні групи (по 6 особин у кожній групі) для проведення шести незалежних серій тестів. Залежно від групи, щурам вводили тест-зразки - водні сухі рослинні екстракти або воду очищену (контрольна група). Введення здійснювали інтрагастрально за допомогою металевого зонда протягом 5 діб у дозі 300 мг/кг маси тіла.

Після завершення курсу введення препаратів проводили серію поведінкових тестів для оцінки функціонального стану центральної нервової системи тварин. Впливу тест-зразків на просторову пам'ять.

Для вивчення впливу тест-зразків на просторову пам'ять та навчання проводили тест "Водний лабіринт Морріса". Експеримент виконували в круглому пластиковому басейні (120 см у діаметрі та 55 см висотою), наповненому водою (26 °C) на 45 см. На рівній відстані один від одного по краю басейну було розташовано 8 різних за кольором та розміром пластикових геометричних фігур (зовнішні орієнтири), що умовно розмежували периметр басейну на 4 сегменти (згідно зі сторонами світу).

На 3 день застосування засобів, перед виконанням основного тесту проводили початковий етап для всіх тварин: платформа розташовувалася на 1,5 см над рівнем води. Протягом двох днів поспіль тварини отримували препарати та розчинник і навчалися знаходити платформу. Для цього тварин тримали з різних позицій кожного дня поміщали в басейн (головою до стіни) на 60 с. Місцем старту були обрані 3 дистальні рівновіддалені від платформи позиції. Тварин, що не встигали виконати завдання за 60 с, поміщали на платформу на 20 с. Тварини, що знаходили платформу, залишались на ній на 15 с. При проведенні контрольного дослідження платформу занурювали на 1 см нижче рівня води. Воду зафарбовували харчовим барвником. Відеоспостереження проводили за допомогою відеокамери. Реєстрували латентний час знаходження платформи впродовж 2 хвилин та відсоток часу перебування у квадранті з платформою [28]. Оцінка поведінкових елементів.

Для оцінки окремих поведінкових елементів щурів використовували тест "Відкрите поле". Обладнання для виконання тесту "Відкрите поле" для щурів представлено освітленою лампою 60 Вт білою квадратною платформою на ніжках розміром 60×60 см з бортами висотою 30 см, підлога якої розділена на 16 однакових квадратів (15×15 см) із отворами діаметром 4 см у центрі кожного квадрата. Критерії оцінки: кількість перетнутих квадратів, заглядань в отвори, вертикальних стійок, фекальних болюсів, актів уринацій та епізодів

грумінгу впродовж 3 хв спостереження [29]. Оцінка рівня тривожності тварин.

Тест "Піднесений хрестоподібний лабіринт", що дозволяє оцінити рівень тривожності тварин, використовували для визначення ансіолітичних властивостей тест-зразків. Прилад складається з двох відкритих рукавів розміром 50×10 см та двох навхрест розміщених закритих рукавів розміром 50×10 см з бортами 10 см. Кімнату, в якій розташовувався прилад, освітлювали лампою 60 Вт. Лабіринт було розміщено на висоті 75 см над підлогою. Після 5 хвилин перебування в затемненій клітці тварину розміщували в центрі лабіринту головою до відкритого рукава. Тестовий період тривав 5 хвилин. Реєстрували латентний період входу в темний рукав, тривалість перебування в світлому та темному рукаві та кількість переходів між рукавами лабіринту [30]. Оцінка впливу на формування і відтворення пам'яті.

Для вивчення впливу речовин на формування і відтворення пам'яті проводили тест "Умовний рефлекс пасивного уникнення". Дослідження проводили у скринінговому режимі без використання амнезіаку. На 4 день введення зразків у тварин формували УРПУ через електробильове покарання після переходу до темного відсіку пристрою. На другий день через 24 год перевіряли наявність УРПУ. За тваринами спостерігали протягом 3 хвилин. Реєстрували час переходу до темного відсіку пристрою та визначали кількість тварин зі сформованим рефлексом [31]. Оцінка поведінки тварин при вільному виборі комфортних умов.

Для вивчення поведінки тварин при вільному виборі комфортних умов застосовували тест "Темно-світла камера". Установка являла собою арену з двома відсіками, відокремленими один від одного перегородкою з невеликим отвором: першим, забарвленим у білий колір і яскраво освітленим, і другим - темним, закритим від доступу світла. Розміри відсіків становили 50×30 см, висота стінок 50 см. Щурів поміщали всередину світлої частини арени, тривалість експерименту для кожної тварини становила 5 хв. Реєстрували час, проведений тваринами в темному відсіку та світлому відсіках, а також кількість переходів між відсіками [32].

Оцінка впливу на когнітивні функції тварин

Вплив на когнітивні функції в умовах гострої стресової ситуації в аверсивному середовищі досліджували в тесті "Екстраполяційне вивільнення" на щурах. Прилад для тесту являє собою прозорий циліндр із пластика з висотою - 50 см, діаметром - 10 см, занурений у ємність (5 дм³) з водою (22-24 °С) на 2 см та закріплений у такому положенні. Через 20 хв після останнього введення досліджуваних зразків щурів обережно вміщували до циліндру головою догори і спостерігали за їх поведінкою протягом 3 хв, реєструючи час пірнання під край циліндра (єдино можливий шлях вивільнення), а також відсоток щурів, що виконали тест протягом 3 хв [33]. Статистична обробка даних.

Результати фармакологічних тестів виражали у вигляді медіани та квартильного розподілу (Median [Q1; Q3]). Порівняння між досліджуваними групами проводили із застосуванням непараметричних методів статистичного аналізу, зокрема критерію Манна-Вітні (Mann-Whitney U test) та критерію Фішера (Fisher's F test). Вірогідність відмінностей оцінювали за рівнем значущості $P < 0,05$. Статистичну обробку експериментальних даних виконували із використанням базового пакета програм Microsoft Excel 2007 та IBM SPSS Statistics 22.

Результат

У *in vivo* моделях сухий водний екстракт зніту шорсткого вводять внутрішньочеревно в дозі 300 мг/кг, щоб компенсувати зниження біодоступності при пероральному введенні тваринам досліджуваних екстрактів. Ця доза використовувалася як скринінгова доза для всіх зразків, оскільки дослідження не включало патологічні стани.

Результати аналізу Морріса "Водяний лабіринт" (Таблиця 1) показали, що під впливом екстракту зніту шорсткого значуще збільшувався відсоток тварин, які успішно завершили тест вірогідно збільшувався та простежувалася певна тенденція до покращення просторової пам'яті.

Таблиця 1

Вплив сухого водного екстракту зніту шорсткого на просторову пам'ять в тесті "водний лабіринт Морріса" (Me [Q25; Q75], n=6)

Експериментальна група	Латентний час знаходження платформи, с	Тривалість перебування в квадранті с платформою, %	Кількість тварин, що пройшли розрішальний тест, %
Негативний контроль	85,5 [42; 120]	27,62 [22,58; 30,00]	66,7
Екстракт зніту шорсткого	49,5 [21; 58]	36,245 [28,92; 47,06]	100*

Примітка: * - відмінності статистично значущі щодо значень групи негативного контролю, $p < 0,05$ (U-критерій Манна-Вітні/F-критерій Фішера).

Результати аналізу "Відкрите поле" показали, що при введенні екстракту зніту шорсткого у дозі 300 мг/кг показники суми орієнтовно-дослідницьких та емоційних реакцій вірогідно не змінювалися у порівнянні з негативним контролем (Таблиця 2).

Таблиця 2

Вплив сухого водного екстракту зніту шорсткого на показники поведінкових реакцій у щурів у тесті "Відкрите поле" (Me [Q25; Q75], n=6)

Досліджуваний показник	Експериментальна група	
	Негативний контроль	Екстракт зніту шорсткого
Перетнутих квадратів	29,5 [24; 42]	35,5 [24; 41]
Вертикальних стійок	7,5 [6; 10]	6,5 [5; 8]
Обстежених отворів	3,0 [0; 6]	1,5 [0; 4]
Сума орієнтовно-дослідницьких реакцій	40,0 [33; 56]	42 [36; 48]
Дефекацій	0,0 [0;1]	0,0 [0;1]
Уринацій	0,0 [0; 1]	0,5 [0; 1]
Актив грумінгу	1,5 [1; 2]	2,5 [2;4]
Сума емоційних реакцій	2,0 [1;3]	4,0 [4; 6]
Сума всіх активностей	41,5 [34; 59]	46,0 [40; 52]

Примітка: * - відмінності статистично значущі щодо значень групи негативного контролю, $p < 0,05$ (U-критерій Манна-Вітні/ F-критерій Фішера).

Наявність протитривожного ефекту підтверджувалося результатами тесту "піднесений хрестоподібний лабіринт" де під впливом екстракту зніту шорсткого у дозі 300 мг/кг тварини продемонстрували інверсію поведінки на користь перебування у відкритому рукаві лабіринту, а також вірогідно збільшувався латентний період входу до темної камери (Таблиця 3).

Також під паливом екстракту зніту відмічалася тенденція до збільшення часу перебування експериментальних тварин у світлій камері в ході тесту "Темно-світла камера", проте статистично значущої відмінності від контрольної групи виявлено не було (Таблиця 4).

Таблиця 3

Вплив сухого водного екстракту зніту шорсткого на показники поведінкових реакцій у щурів у тесті "піднесений хрестоподібний лабіринт" (Me [Q25; Q75], n=6)

Досліджуваний показник	Експериментальна група	
	Негативний контроль	Екстракт зніту шорсткого
Латентний період входу до темної камери, с	26,5 [17; 38]	28,5 [20; 41]
Час перебування в центрі майданчика, с	24,5 [22; 28]	20,5 [14; 22]
Час перебування у закритому рукаві, с	210,0 [195; 226]	122,0 [98; 169]
Час перебування у відкритому рукаві, с	63,5 [50; 83]	155,5 [111; 180]*
Кількість переходів між рукавами	11,0 [10; 13]	14,0 [11; 16]

Примітка: * - відмінності статистично значущі щодо значень групи негативного контролю, $p < 0,05$ (U-критерій Манна-Вітні/ F-критерій Фішера).

Таблиця 4

Вплив сухого водного екстракту зніту шорсткого на показники поведінкових реакцій у щурів у тесті "Темно-світла камера" (Me [Q25; Q75], n=6)

Експериментальна група	Кількість переходів між камерами	Час перебування у світлій камері, с	Час перебування у темній камері, с
Негативний контроль	3,0 [1; 5]	77,5 [40; 175]	222,5 [125; 260]
Екстракт зніту шорсткого	2,5 [1; 3]	133,0 [63; 215]	167,0 [85; 237]

Примітка: * - відмінності статистично значущі щодо значень групи негативного контролю, $p < 0,05$ (U-критерій Манна-Вітні/ F-критерій Фішера).

Помірний рівнозначний вплив екстракту на формування та відтворення пам'яті у експериментальних тварин був підтверджений тестом умовного рефлексу пасивного уникнення, де під впливом дослідного зразка значуще збільшувалася кількість тварин, в яких в ході тесту сформувався рефлекс (Таблиця 5).

Таблиця 5

Вплив сухого водного екстракту зніту шорсткого на формування умовного рефлексу пасивного уникнення в інтактних щурів (Me [Q25; Q75], n=6)

Експериментальна група	Латентний період входу в камеру на етапі тренування, с	Латентний період входу в камеру на етапі тестування, с	% тварин із сформованим УРПУ
Негативний контроль	24,0 [19; 28]	126,0 [71; 180]	33,3
Екстракт зніту шорсткого	23,0 [11; 26]	180,0 [180; 180]	83,3*

Примітка: * - відмінності статистично значущі щодо значень групи негативного контролю, $p < 0,05$ (U-критерій Манна-Вітні/ F-критерій Фішера).

В ході тесту "екстраполяційного вивільнення" на тлі застосування екстракту зніту шорсткого значно зменшувався час на виконання задачі з якою впоралися 100 % експериментальних тварин (Таблиця 6).

Таблиця 6

Вплив сухого водного екстракту зніту шорсткого на показники інтактних щурів у тесті "екстраполяційне вивільнення" (Me [Q25; Q75], n=6)

Експериментальна група	Час на вирішення задачі, с	% тварин, що впоралися
------------------------	----------------------------	------------------------

		із завданням
Негативний контроль	73,0 [55; 151]	83,3
Екстракт зніту шорсткого	30,0 [27; 40] *	100

Примітка: * - відмінності статистично значущі щодо значень групи негативного контролю, $p < 0,05$ (U-критерій Манна-Вітні/ F-критерій Фішера).

Таким чином за результатами показано, що екстракт зніту шорсткого виявляє виражену нейротропну дію без вираженого седативного ефекту, а також покращує когнітивні функції здорових тварин.

Заявлений новий спосіб одержання сухого водного екстракту з листя зніту шорсткого, що виявляють нейротропну дію, визначається рядом переваг:

1) простота виконання та можливість здійснення на стандартному обладнанні у промислових умовах України;

2) використання як екстрагенту води очищеної, тобто спосіб доступний, екологічно безпечний, дешевий, такий, що не вимагає роботи з отруйними та шкідливими для здоров'я людини реактивами;

3) доведена наявність маркерних біологічно активних сполук, а саме гідроксикоричних кислот (хлорогенової кислоти, галлової кислоти) та флавоноїдів (авікулярину, гуаяверину, ізокверцитрину, гіперозиду), що обумовлюють наявність фармакологічної дії екстракту;

4) заявлений спосіб дозволяє одержати екстракт із загальним вмістом фенольних сполук для листя зніту шорсткого - 22,77 мг ГА екв./г;

5) наявність вираженої нейротропної активності екстракту з листя зніту шорсткого, одержаного за заявленим способом;

6) перспективність використання одержаного екстракту як лікарської субстанції для одержання різних лікарських форм, одержаного заявленим способом;

7) нетоксичність екстракту, одержаного за заявленим способом, дозволяє використовувати його довгостроково при лікуванні за рекомендацією лікаря.

На кресленні зображено ВЕТІХ-профіль сухих екстрактів зніту шорсткого та стандартів (хлорогенова кислота, гіперозид, гуаяверин, ізокверцитрин) під UV 366 нм після дериватизації (а) та білим світлом після дериватизації (б).

Джерела інформації:

1. Sheidai, M., et al., Species delimitation in *Epilobium* (sec. *Epilobium*, Onagraceae): morphological, molecular and palynological data. *Biologia* 2018; 73(1): 1-8.

2. Adamczak, A., et al., Fireweed (*Epilobium angustifolium* L.): botany, phytochemistry and traditional uses. A review. *Herba Pol* 2019; 65(3): 51-63.

3. Barbarossa, A., et al. Efficacy of willow herb (*Epilobium angustifolium* L. and *E. parviflorum* Schreb.) crude and purified extracts and oenothien B against prostatic pathogens. *Antibiotics* 2025; 14(2):117-126.

4. Федорончук, М.М., Клімович Н.Б. Участь видів роду *Epilobium* (Onagraceae) у біотопах України. *Chornomorski Botanic J* 2020; 16(1): 55-61.

5. Volochai V., et al., The study of growth conditions of *Epilobium angustifolium* L. (Onagraceae Juss.) in natural populations on the territory of Ukraine. *Agroecol J* 2020; 166-172.

6. Monschein, M., Jaindl, K., Buzinkic, S., Bucar, F. Content of phenolic compounds in wild populations of *Epilobium angustifolium* growing at different altitudes. *Pharm Biol* 2015; 53(11):1576-82.

7. Karakaya, S., et al., In vivo bioactivity assessment on *Epilobium* species: A particular focus on *Epilobium angustifolium* and its components on enzymes connected with the healing process. *J Ethnopharmacol* 2020; 262: 113207-20.

8. Uminska, K., et al., Assessment of the phenolics content in *Epilobium angustifolium* and *Epilobium hirsutum* extracts and their pharmacological activity. *Arch Pharm* 2025; 358(5): e12001.

9. Ak, G., et al., Shedding light into the connection between chemical components and biological effects of extracts from *Epilobium hirsutum*: is it a potent source of bioactive agents from natural treasure? *Antioxidants* 2021; 10(9):1389-1411.
10. Mykhailenko, O., et al., The phenology of *Epilobium hirsutum* L.: assessing marker compounds variability of a pharmaceutically important plant remedy. *Frontiers in Pharmacology*, 2025, 16: 1602819-44.
11. Vlase, A.-M., et al. Investigation of *Epilobium hirsutum* L. optimized extract's anti-inflammatory and antitumor potential. *Plants* 2024; 13: 198-223.
12. Armonavičius, D., Stankevičius, M., Maruška, A. Extraction of bioactive compounds and influence of storage conditions of raw material *Chamaenerion angustifolium* (L.) Holub using different strategies. *Molecules* 2024; 29: 5530-48.
13. Nowak, A., et al. Application of green-extraction technique to evaluate of antioxidative capacity of wild population of fireweed (*Epilobium angustifolium*). *Herba Pol* 2019; 65(40): 18-30.
14. Nowak, A., et al., *Epilobium angustifolium* L. extracts as valuable ingredients in cosmetic and dermatological products. *Molecules* 2021; 26(11): 3456-79.
15. Verpoorte, R., H.K. Kim, Y.H. Choi, Trivialities in metabolomics: Artifacts in extraction and analysis. *Front Mol Biosci* 2022; 9: 972190-201.
16. Gil-Martin, E., et al., Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. *Food Chemistry* 2022; 378: 131918-57.
17. Mykhailenko, O., et al., Application of Quality by Design approach to the pharmaceutical development of anticancer crude extracts of *Crocus sativus* perianth. *Sci Pharm* 2022; 90(1): 19-42.
18. Mykhailenko, O., et al., Bio-guided bioactive profiling and HPLC-DAD fingerprinting of Ukrainian saffron (*Crocus sativus* stigmas): moving from correlation toward causation. *BMC Complement Med Ther* 2021; 21(1): 203-18.
19. Brendler, T., et al., Suitability of botanical extracts as components of complex mixtures used in herbal tea infusions-challenges and opportunities. *Frontiers in Pharmacology* 2022; 13: 1013340-53.
20. Pandit, B., Saha, P., Eco-friendly alternatives to conventional solvents: Innovations and applications in pharmaceutical manufacturing. *Sustainable Chemistry for Climate Action* 2025; 7: 100140-57.
21. Piwowarski, J.P., et al., Evaluation of the effect of *Epilobium angustifolium* aqueous extract on LNCaP cell proliferation in in vitro and in vivo models. *Planta Med* 2017; 83(14-15): 1159-1168.
22. Sever, M., In Vivo effect of *Epilobium hirsutum* L. and *Viscum album* L. on protein and mRNA expressions of rat liver vitamin D3 metabolizing CYP24A1 and CYP27B1 enzymes. 2012: Middle East Technical University [Master of Science].
23. EMA/HMPC/712510/2014, Assessment report on *Epilobium angustifolium* L. and/or *Epilobium parviflorum* Schreb., herba. 2016, European Medicines Agency, London, UK: Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). p. 20.
24. Dzhafer, S., et al., Phytochemical profile and in vitro and in vivo anticonvulsant and antioxidant activities of *Epilobium hirsutum*. *Int J Sec Metabolite* 2020; 7(2): 63-76.
25. Kiss, A., J. Kowalski, and M.F. Melzig, Effect of *Epilobium angustifolium* L. extracts and polyphenols on cell proliferation and neutral endopeptidase activity in selected cell lines. *Pharmazie* 2006; 61(1): 66-9.
26. Kiss, A., Kowalski, J., Melzig, M.F., Compounds from *Epilobium angustifolium* inhibit the specific metalloproteinases ACE, NEP and APN. *Planta Med*. 2004; 70(10): 919-23.
27. Directive 2010/63/ EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010, OJ L 276, 20.10.2010. 2010: 33-79.
28. Bromley-Brits, K., Deng, Y., Song, W., Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp* 2011; (53): 2920-5.
29. Seibenhener, M.L., Wooten, M.C, Use of the Open Field Maze to measure locomotor and

anxiety-like behavior in mice. J Vis Exp 2015; (96): e52434-10.

30. Waif, A.A., Frye, C.A., The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. Nat Protoc 2007; 2(2): 322-8.

31. Eagle, A.L., Wang, H., Robison, A.J., Sensitive assessment of hippocampal learning using temporally dissociated passive avoidance task. Bio Protoc 2016; 6(11): e1821-9.

32. Takao, K., Miyakawa, T., Light/dark transition test for mice. J Vis Exp 2006; 13(1): 104-107.

33. Havrylov, I.O., Shtrygol, S.Y., Investigation of the effect of a modified fragment of neuropeptide Y on memory phases and extrapolation escape of animals. Ceska Slov Farm 2021; 70(3): 93-101.

