

Корисна модель належить до галузі фармації та медицини, а саме до способів отримання фітосубстанції з рослинної сировини та розробки відповідних фітопрепаратів у різних лікарських формах для лікування та профілактики захворювань печінки. У сучасній медичній практиці широко використовуються лікарські засоби на основі рослинної сировини, які характеризуються більшою безпечністю відносно побічної дії, низькою алергічністю, токсичністю та можливістю тривалого використання.

Відомим є спосіб отримання комплексу біологічно активних речовин з гепатопротекторною та антиоксидантною активністю [1], який передбачає екстрагування подрібненої сировини, а саме трави гірчаку печечуйного п'ятикратним об'ємом води очищеної при температурі 40 °C протягом 40 хвилин з подальшим сушінням отриманого водного витягу методом ліофілізації.

Недоліком відомого способу є недостатній рівень технологічності, який не забезпечує повного вилучення біологічно активних речовин, оскільки як екстрагент використовується гаряча вода очищена, а отже розчинні в етанолі компоненти не потрапляють у витяжку. Це обумовлює недостатній спектр фармакологічної активності. Крім того процес ліофілізації є трудомістким та вартісним.

Найближчим аналогом корисної моделі є отримання екстракту трави парила звичайного з гепатопротекторною активністю [2]. За відомим способом сировину екстрагують 40 % етанолом протягом 30 хвилин, співвідношення сировина:екстрагент 1:10-1:15, екстракт фільтрують і висушують.

Недоліком відомого способу є недостатня фармакологічна активність отриманого комплексу, оскільки екстракція проводиться при кип'ятінні екстрагенту (40 % етанол), що може спричинити руйнування деяких біологічно активних речовин. Отриманий засіб за відомим способом характеризується лише гепатопротекторною властивістю.

В основу корисної моделі поставлена задача вдосконалити відомий спосіб, в якому шляхом зміни технологічного прийому, спрямованого на максимальне вилучення з рослинної сировини трави чорнобривців розлогих необхідного комплексу біологічно активних речовин (БАР), збереження їх в одержаній субстанції у формі густого екстракту, досягають одержання вискоєфективних лікарських засобів з яскраво вираженими гепатопротекторною та антиоксидантною діями.

Останні роки рослини роду *Tagetes* L. привертають увагу науковці завдяки вмісту біологічно активних речовин широкого спектра дії, серед яких каротиноїди, флавоноїди, амінокислоти, органічні кислоти, дубильні речовини, ефірні олії, а отже можуть використовуватися як жарознижувальний, протикашлевий, заспокійливий засоби, а також при лікуванні захворювань і порушень функції печінки, під час колюк, діареї, шкірних захворювань [3, 4].

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб отримання фармакологічно активної рослинної субстанції з трави чорнобривців розлогих включає технологічний етап екстрагування, фільтрації та висушування, згідно з корисною моделлю, процес екстрагування проводять шляхом екстрагування комплексу біологічно активних речовин рослинної сировини чорнобривців розлогих трави 60 % етанолом у співвідношенні 1:10 методом перколяції для максимального виснаження сировини з подальшим висушуванням у вакуумному роторному випаровувачі до отримання густого екстракту.

Усі параметри заявленого способу визначено експериментальним шляхом з урахуванням біологічної активності одержаних субстанцій, ефективності, доступності реактивів.

У ході попередніх досліджень екстрагування проводили водою очищеною та водно-етанольними сумішами 40, 50, 60, 70 %. Спектрофотометричним методом визначали в кожній із одержаних субстанцій кількісний вміст суми флавоноїдів, суми гідроксикоричних кислот, поліфенолів і втрату в масі при висушуванні. Шляхом підбору нами було встановлено, що для отримання фітосубстанції з чорнобривців розлогих трави з найбільш повним вилученням суми флавоноїдів, суми гідроксикоричних кислот і поліфенолів оптимальним є використання в якості екстрагенту етанолу 60 % у співвідношенні "сировина:екстрагент" 1:10 методом перколяції із циркуляцією екстрагенту. Також у ході фітохімічного дослідження густого екстракту з чорнобривців розлогих трави, було встановлено значний вміст сполук фенольної природи - суми флавоноїдів (10,7 %), суми гідроксикоричних кислот (7,2 %), поліфенолів (9,8 %), що можуть здійснювати вплив на організм людини, а одержана фітосубстанція є перспективною для отримання лікарських засобів з гепатопротекторною та антиоксидантною активністю [4].

Спосіб ілюструється наступними прикладами:

Приклад 1

100 г подрібнених до розміру частинок, які проходять крізь сито № 11200 (з максимальним допуском для отвору 0,77 мм), повітряно-сухої чорнобривців розлогих трави змочували достатньою кількістю (200 мл) екстрагенту (60 % етанолу) і залишали на 4 год. при кімнатній температурі для набухання. Потім замочену сировину переносили в перколятор і заливали 1000 мл 50 % етанолу, настоювали протягом 24 год. при кімнатній температурі. Після першого циклу екстрагування, витяжку зливали і знову подавали на сировину, перемішували і настоювали протягом 30 хв. Для максимального виснаження сировини екстрагування проводили 3 рази. Етанольну витяжку зливали, співвідношенні 1:10, екстрагували на водяній бані протягом 2 год. Одержані етанольну та водну витяжки об'єднували, фільтрували крізь паперовий фільтр, згущували шляхом упарювання за

температури 80-90 °С до густого залишку. Згущену витяжку висушували у вакуумно-ротаторному випаровувачі за температури 75-80 °С до отримання сухої фітосубстанції з вмістом води до 15 %.

Вихід фітосубстанції з чорнобривців розлогих трави склав 39,42 %.

Отриманий продукт - однорідна густа в'язка маса темно-коричневого кольору, з приємним ароматним запахом, розчинна у холодній, гарячій воді, малорозчинна у 96 % етанолі.

Приклад 2

Дослідження гепатопротекторної активності густого екстракту з чорнобривців розлогих трави (ЕТЧР) проведено за умов відтворення гострого парацетамолового гепатиту, який моделювали введенням парацетамолу щурам у дозі 1250 мг/кг у шлунок 1 раз на добу у вигляді суспензії в 2 % розчині крохмального гелю протягом 2 діб [5].

ЕТЧР і препарат порівняння Силімарин вводили внутрішньошлунково у лікувально-профілактичному режимі протягом 10 діб (7 діб до початку експерименту, 2 доби на тлі введення парацетамолу, 1 доба після моделювання гепатиту), ЕТЧР вивчали у діапазоні доз 5 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг. Препарат порівняння Силімарин вводили у дозі 25 мг/кг. Контрольні тварини одержували еквівалентну кількість води.

Декапітацією щурів виводили з експерименту, збирали кров, вилучали печінку для приготування гомогенату з метою проведення біохімічного аналізу. Вплив препаратів на функціональний стан печінки при її ураженні оцінювали за біохімічними показниками, які досліджували у тканині печінки та сироватці крові. Визначали показники системи перекисне окислення ліпідів - антиоксидантна система ПОЛ-АОС. За допомогою набору реактивів визначали активність маркерного ферменту цитолізу аланінамінотрансферази (АлАТ).

Результати експерименту наведені у таблицях 1-4.

Таблиця 1

Вплив густого екстракту з чорнобривців розлогих трави (ЕТЧР) на синдром цитолізу за умов гострого парацетамолового гепатиту у щурів

№ за/п	Умови досліджу	АлАТ, мкат/л	p
1	Інтактний контроль (n=8)	0,68±0,05	-
2	Контрольна патологія (n=8)	1,84±0,06	p ₂₋₁ <0,001
3	ЕТЧР, 5 мг/кг, (n=8)	1,37±0,03	p ₃₋₁ <0,001 p ₃₋₂ <0,001 p ₃₋₆ <0,01
4	ЕТЧР, 25 мг/кг, (n=8)	0,76±0,03	p ₄₋₂ <0,001 p ₄₋₃ <0,001 p ₄₋₅ <0,001 p ₄₋₆ <0,01
5	ЕТЧР, 50 мг/кг, (n=8)	1,1946,05	p ₅₋₁ <0,001 p ₅₋₂ <0,001
6	Силімарин, 25 мг/кг, (n=8)	1,02±0,06	p ₆₋₁ <0,01 p ₆₋₂ <0,001

ЕТЧР у діапазоні доз 5, 25, 50 мг/кг чинив потужну антицитолітичну дію, що встановлено за зниженням маркерного ферменту цитолізу АлАТ, відповідно, у 1,3 разу - 3,2 разу - 1,5 разу. Встановлена дозозалежність антицитолітичної дії досліджуваного засобу ЕТЧР дозволяє встановити, що найбільше зниження синдрому цитолізу зареєстровано за умов введення ЕТЧР у дозі 25 мг/ кг (таблиця 1). Окрім того, антицитолітична дія ЕТЧР у дозі 25 мг/кг, вірогідно, перевищує ефективність референс-препарату Силімарину у дозі 25 мг/кг.

Таблиця 2

Вплив густого екстракту з чорнобривців розлогих трави (ЕТЧР) на ваговий коефіцієнт печінки щурів (КМП) за умов гострого парацетамолового гепатиту у щурів

№ за/п	Умови досліджу	КМП, %	p
1	Інтактний контроль (n=8)	2,12±0,03	-
2	Контрольна патологія (n=8)	3,46±0,04	p ₂₋₁ <0,01
3	ЕТЧР, 5 мг/кг, (n=8)	3,13±0,04	p ₃₋₁ <0,01 p ₃₋₂ <0,001 p ₃₋₃ <0,01

4	ЕТЧР, 25 мг/кг, (n=8)	2,33±0,05	p ₄₋₁ <0,01 p ₄₋₂ <0,001 p ₄₋₃ <0,001 p ₄₋₅ <0,001 p ₄₋₆ <0,01
5	ЕТЧР, 50 мг/кг, (n=8)	2,98±0,03	p ₅₋₁ <0,001 p ₅₋₂ <0,01
6	Силімарин, 25 мг/кг, (n=8)	2,58±0,03	p ₆₋₁ <0,001 p ₆₋₂ <0,01

За впливом на інтегральний показник - коефіцієнт маси печінки щурів (КМП) ЕТЧР, був максимально ефективним у дозі 25 мг/кг, у якій КМП щурів із гострим парацетамоловим гепатитом був вірогідно нижчий від показника групи контрольної патології на 26 % (p<0,001), показника групи, що отримувала препарат порівняння Силімарин на 10 % (p<0,01) (таблиця 2).

Таблиця 3

Вплив густого екстракту з чорнобривців розлогих трави (ЕТЧР) на показники ПОЛ-АОС у сироватці крові за умов гострого парацетамолового гепатиту у щурів

№ за/п	Умови досліджу	ТБК-реактанти, мкмоль/л	Відновлений глутатіон, мкмоль/л
1	Інтактний контроль (n=8)	1,08±0,03	32,7±1,94
2	Контрольна патологія (n=8)	3,09±0,18*	11,9±1,07
3	ЕТЧР, 5 мг/кг, (n=8)	2,08±0,05*#	19,7±1,33
4	ЕТЧР, 25 мг/кг, (n=8)	1,17±0,04*#&@	30,8±2,41
5	ЕТЧР, 50 мг/кг, (n=8)	1,91±0,05*#	23,1±1,79
6	Силімарин, 25 мг/кг, (n=8)	1,53±0,06*#	24,1±1,06

Примітки:

1. Статистично достовірні відмінності з показниками групи інтактного контролю: * - p<0,01;
2. Статистично достовірні відмінності з показниками групи контрольної патології: # - p<0,01;
3. Статистично достовірні відмінності з показниками групи Силімарину: - p<0,05;
4. Статистично достовірні відмінності з показниками групи ЕТЧР, 5 мг/кг: - p<0,01;
5. Статистично достовірні відмінності з показниками групи ЕТЧР, 5 мг/кг: &- p<0,01.

Таблиця 4

Вплив густого екстракту з чорнобривців розлогих трави (ЕТЧР) на показники ПОЛ-АОС у гомогенаті печінки за умов гострого парацетамолового гепатиту у щурів

№ за/п	Умови досліджу	ТБК-реактанти, мкмоль/г	Відновлений глутатіон, мкмоль/г
1	Інтактний контроль (n=8)	80,6±3,15	85,2±3,79
2	Контрольна патологія (n=8)	233±4,87*	24,8±1,35*
3	ЕТЧР, 5 мг/кг, (n=8)	163±5,62*#	50,9±3,20*#
4	ЕТЧР, 25 мг/кг, (n=8)	84,6±1,87*#&@	81,9±2,88*#&@
5	ЕТЧР, 50 мг/кг, (n=8)	128±6,45*#	64,5±1,99*#
6	Силімарин, 25 мг/кг, (n=8)	118±6,75*#	73,3±1,34*#

Примітки:

1. Статистично достовірні відмінності з показниками групи інтактного контролю: * - p<0,01;
2. Статистично достовірні відмінності з показниками групи контрольної патології: # - p<0,001;
3. Статистично достовірні відмінності з показниками групи Силімарину: \$ - p<0,05;
4. Статистично достовірні відмінності з показниками групи ЕТЧР, 5 мг/кг: @ - p<0,001;
5. Статистично достовірні відмінності з показниками групи ЕТЧР, 5 мг/кг: &- p<0,01.

Відомо, що провідною ланкою патогенезу гепатитів різної етіології є оксидативний стрес. Встановлена нами значна активація процесів ПОЛ як у сироватці крові (таблиця 3), так і у гомогенаті печінки (таблиця 4) у групі щурів контрольної патології із гострим парацетамоловим гепатитом, є підтвердженням даних сучасних наукових досліджень [6].

Дозозалежна антиоксидантна дія ЕТЧР дозволяє встановити, що найбільший антиоксидантний потенціал досліджуваній засіб чинить у дозі 25 мг/кг, що верифіковане за зниженням ТБК- реактантів:

- у сироватці крові у 2,6 разу ($p < 0,01$) відносно групи контрольної патології та у КЗ рази ($p < 0,05$) відносно групи препарату порівняння Силімарину (таблиця 3);

- у гомогенаті печінки у 2,8 разу ($p < 0,001$) відносно групи контрольної патології та у 1,4 разу ($p < 0,05$) відносно групи препарату порівняння Силімарину (таблиця 4),

БАР екстракту трави *Tagetes patula* L. нормалізують роботу ендогенної антиоксидантної системи організму, що встановлено за достовірним збільшенням відновленого глутатіону як у сироватці крові, так і у гомогенаті печінки за умов введення досліджуваного засобу у діапазоні доз 5, 25 і 50 мг/кг на тлі гострого парацетамолового гепатиту у щурів. Максимальна антиоксидантна дія встановлена при введенні ЕТЧР у дозі 25 мг/кг (таблиця 3, таблиця 4).

Досліджуваний засіб ЕТЧР у діапазоні доз 5, 25 і 50 мг/кг чинить потужну гепатопротекторну дію, яка верифікована за достовірною нормалізацією коефіцієнта маси печінки, достовірним зниженням синдрому цитолізу та значною антиоксидантною дією.

За всіма досліджуваними показниками ЕКЧР у дозі 25 мг/кг статистично достовірно перевищував ефективність препарату порівняння, аналогу за фармакологічною дією Силімарину у дозі 25 мг/кг.

Отже, вищенаведене підтверджує, що запропонований спосіб є технологічним, простим у виконанні, економічно доцільним, не потребує використання спеціального обладнання, та дозволить отримати нову фармакологічно активну рослинну субстанцію, що містить значну кількість біологічно активних речовин фенольної природи, а саме густий екстракт з трави чорнобривців розлогих з вираженою гепатопротекторною та антиоксидантною активністю.

Джерела інформації:

1. Патент № 106927 Україна, МПК А61К 36/704, А61Р 1/16. Спосіб отримання комплексу біологічно активних речовин з гепатопротекторною та антиоксидантною активністю / Лукіна І.А., Мазулін О.В., Беленічев І.Ф., Абрамов А.В., Мазулін Г.В. : заявник і патентові. ЗДМУ, Лукіна І.А., Мазулін О.В., Беленічев І.Ф., Абрамов А.В., Мазулін Г.В. - u201511547; заявл. 23.11.15; опубл. 10.05.16, Бюл. № 9.

2. Патент 108382, UA. МПК А61К 36/738 А61К 127/00 А61К 131/00 А61К 133/00 А61К 135/00. Спосіб одержання екстракту трави парила звичайного з гепатопротекторною активністю /Грицик А.Р., Гузьо Н.М., Угрин О.М.: заявник і патентовл. Грицик, А.Р., Гузьо Н.М., Угрин О.М - u201301016; заявл, 28.01.2013; опубл. 27.04.2015, Бюл. № 8.

3. Дослідження флавоноїдів чорнобривців золотистих (*Tagetes Lucida* Cav.) / С.М. Марчишин, Л.В. Костишин, Т.В. Валько, В.М. Кіщук, Е.А. Паращук // Медична та клінічна хімія, 2021. Т. 23. № 4. С. 95-102.

4. Traditional uses, Phyto-chemistry and pharmacological activities of *Tagetes patula* L. / M. Riaz, R. Ahmad, N. U. Rahman et al. J. Ethnopharmacol. 2020. Vol. 255. P. 112718.

5. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. // За ред.. О.В. Стефанова. Київ: Авіцена. 2001. 528 с.

6. Yew W. W., Chang K. C., Chan D. P. Oxidative Stress and First-Line Antituberculosis Drug-Induced Hepatotoxicity. Antimicrob Agents Chemother. 2018 Vol.62(8). P. e02637 - 17.