

А. С. Калениченко, Л. Н. Малоштан

Скрининговое исследование антикоагулянтной, мембраностабилизирующей и противовоспалительной активности густого экстракта из листьев лещины обыкновенной

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Ключевые слова: экстракт из листьев лещины обыкновенной, лекарственные растения, фармакологический скрининг

Распространенность венозных заболеваний, постоянное омоложение контингента больных, прогрессирующее течение с развитием декомпенсированных форм хронической венозной недостаточности и развитие опасных осложнений свидетельствуют об актуальности и высокой значимости фармакотерапии варикозной болезни. Известно, что одними из ведущих факторов развития осложнений варикозной болезни является тромбообразование и воспаление [1]. Острые и хронические венозные тромбозы могут стать причиной таких тяжелых осложнений, как дерматиты, экземы, переходящие в гнойное воспаление с образованием абсцессов, трофических язв, тромбозов легочной артерии, поэтому первоочередной задачей современной фармакотерапии венозных заболеваний является устранение тромботического состояния системы гемостаза и явлений воспаления в стенках сосудов и окружающих тканях [2]. Для профилактики и лечения тромбозов и тромбозов осложненных широко используются антикоагулянтные препараты [3, 4]. Все они обладают недостатками при использовании у той или иной группы пациентов, что стимулирует поиск новых антикоагулянтов, которые не приводили бы к высокой частоте геморрагических осложнений, не вызывали бы активации тромбоцитов, развитие тромбоцитопении и были бы удобны в использовании.

На сегодняшний день существует ряд биологически активных добавок, в

составе которых содержится лещина обыкновенная: Лещина форте (Россия), Антиварикоз (Украина), Веновит (Украина), Фитор (Украина), Асклезан А (Россия) и др., применяемые при варикозной болезни для нормализации кровообращения, повышения венозного тонуса, нормализации микроциркуляции в нижних конечностях. Настои и отвары из листьев и коры лещины обыкновенной широко применяются в народной медицине при варикозных язвах, капиллярных геморрагиях, кишечно-желудочных кровотечениях и других заболеваниях. Полученная сухой перегонкой древесины лещины – жидкость «Л-2 Лесная» – предназначалась для лечения кожных заболеваний: экземы, нейродермита, стрептодермии, псориаза, но лечебный эффект, по-видимому, был слабым и этот препарат сняли с производства [5]. Как следствие недостаточной изученности сырья, народная медицина предоставляет несравненно большее значение лещине обыкновенной, чем научная. В связи с этим было целесообразно провести исследование фармакологической активности густого экстракта лещины обыкновенной, полученного на кафедре химии природных соединений Национального фармацевтического университета под руководством профессора О. П. Хворост. Лещина обыкновенная была собрана на территории Украины.

Цель исследования – проведение скрининговых исследований фармакологической активности густого экстракта из листьев лещины обыкновенной, а именно антикоагулянтной, противовоспалительной и мембраностабилизирующей.

Материалы и методы. Объектом скрининговых фармакологических исследований был экстракт из листьев лещины обыкновенной в концентрации 13 мг/мл. Все исследования проводили на белых беспородных крысах массой 180–250 г. Животные получали стандартное питание в соответствии с действующими нормами [6]. Экспериментальные исследования проводили в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, и национальным законодательством Украины. Антикоагулянтную активность определяли в эксперименте *in vitro* методом Бюркера [7]. Принцип метода заключается в определении времени спонтанного появления первых нитей фибрина в цельной крови. 2–3 капли крови из хвоста белых нелинейных крыс помещали на часовое стекло и добавляли исследуемый экстракт в разведениях – 1:2, 1:4, 1:8. Как контроль использовали кровь, в которую добавляли 0,9 % раствор хлорида натрия в соотношении 1:1 и раствор гепарина в концентрации 1 ЕД/мл (Гепарин-Белмед). Следующим этапом исследования было определение антикоагулянтной активности экстракта из листьев лещины *in vivo*. Исследование проводили на белых беспородных крысах по 6 крыс в группе: 1 группа – интактный контроль (животные получали дистиллированную воду); 2, 3 и 4 группы – крысы, получавшие исследуемый экстракт в дозе 30 мг/кг, 60 мг/кг и 90 мг/кг соответственно. В течение 4 суток животным 1 раз в 1 сутки внутривентриально вводили исследуемый экстракт. На 4 сутки производили забор крови из хвоста крыс (через 60 мин после введения препарата) и определяли время свертывания крови [7].

Мембраностабилизирующую активность экстракта определяли в условиях *in vivo* методом Jager FC по сравнению с эскувитом (таблетки по 40 мг, производства Артериум, Украина) [8]. Экспериментальные животные (крысы) были распределены на 5 групп: 1 – интактный контроль – животные, которым внутривентриально вводили эквивалентное их массе количество воды; 2, 3 и 4 группы –

крысы, получавшие в течение 4 суток 1 раз в 1 сутки внутривентриально экстракт из листьев лещины в дозах 30 мг/кг, 60 мг/кг и 90 мг/кг, 5 группа – животные, получавшие в аналогичном режиме препарат сравнения эскувит в дозе 10 мг/кг. Мембраностабилизирующее действие определяли на 4 сутки эксперимента (через 60 мин после введения экстракта). По значениям экстинкции растворов опытной и контрольной проб рассчитывали степень спонтанного гемолиза эритроцитов как показатель мембраностабилизирующего действия.

Исследование противовоспалительной активности экстракта проводили на модели карагенинового отека [9]. Животные были разделены на группы по 6 крыс: 1 группа – контрольная патология (животные с карагениновым отеком, которые получали дистиллированную воду); 2, 3 и 4 группы – животные, которые получали исследуемый экстракт из листьев лещины в дозе 30 мг/кг, 60 мг/кг и 90 мг/кг соответственно; 5 группа – животные, которые получали препарат сравнения диклофенак натрия (таблетки по 50 мг производства «Червона зірка») в его эффективной дозе 8 мг/кг. Исследуемый экстракт из листьев лещины вводили в лечебно-профилактическом режиме – внутривентриально 1 раз в 1 сутки в течение 3 суток и на 4 сут за 1 ч до инъекции карагенина. Диклофенак вводили внутривентриально однократно в виде водного раствора за 1 ч до инъекции карагенина. Для воспроизведения острого асептического воспаления у крыс использовали 1 % раствор карагенина, который вводили субплантарно в заднюю стопу крысы в объеме 0,1 мл. Измерение объема стопы у крыс проводили с помощью механического онкометра по А. С. Захаревському. О развитии отека судили по увеличению объема лапы в динамике через 1, 2, 3, 4 и 24 ч после введения карагенина. Антиэкссудативную активность веществ определяли по способности уменьшать отеки в опытных группах животных по сравнению с контрольной группой и выражали в процентах [9].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного

пакета Statistica 6.0. Статистический анализ данных выполняли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса на уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Поскольку при развитии варикозной болезни наблюдается замедление кровотока, что со временем приводит к повышению свертываемости крови и тромбообразованию, цель исследования – изучение влияния экстракта на процессы коагуляции. На этапе исследования *in vitro* было установлено, что под действием экстракта лещины в исходной концентрации 13 мг/мл наблюдали достоверное увеличение времени свертывания крови в 2 раза по сравнению с контролем, экстракт несколько уступал эффекту гепарина (табл. 1). Под влиянием экстракта в разведениях 1:2, 1:4, 1:8 время свертывания крови было на уровне контроля.

В дальнейшем исследовали антикоагулянтную активность экстракта из листьев лещины в опытах *in vivo* в дозах 30 мг/кг, 60 мг/кг и 90 мг/кг. По полученным данным, приведенным в таблице 2, экстракт в дозе 30 мг/кг достоверно увеличивал время свертывания крови в 1,5 раза по сравнению с контролем. Антикоагулянтная активность экстрак-

та в дозе 60 мг/кг и 90 мг/кг была почти на одном уровне, об этом свидетельствует замедление времени свертывания крови по сравнению с контролем в 2,0 и 1,9 раза соответственно. Итак, исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что экстракт из листьев лещины проявляет антикоагулянтную активность, причем наиболее выраженную в дозе 60 мг/кг.

Известно, что необходимым условием для проявления венотонизирующего эффекта является наличие у препарата мембраностабилизирующей активности, которая зависит от устойчивости клеточных мембран. Поэтому следующим этапом исследования экстракта стало изучение этого вида активности на модели спонтанного гемолиза эритроцитов по Ягерю. В результате исследований было установлено, что густой экстракт из листьев лещины в дозе 90 мг/кг достоверно уменьшает степень гемолиза в 1,8 раза по сравнению с интактным контролем, а в дозах 30 мг/кг и 60 мг/кг уменьшает степень гемолиза более чем в 3 раза, превышая активность эскувита (табл. 3).

По данным литературы, в составе лещины обыкновенной содержатся

Таблица 1

Время свертывания крови крыс под влиянием различных концентраций экстракта из листьев лещины обыкновенной in vitro, $M \pm m$ ($n = 6$)

Условие эксперимента	Время свертывания крови, с	Изменения свертывания, %
Контроль (цельная кровь)	140,4 ± 1,52**	–
Экстракт без разведения	287,8 ± 3,11*/**	105
Разведенный экстракт (1:2)	144,0 ± 1,59**	3
Разведенный экстракт (1:4)	141,8 ± 3,03**	1
Разведенный экстракт (1:8)	142,6 ± 2,35**	1,6
Гепарин 1 ЕД/мл	309,0 ± 2,65*	120

Примечание. *Достоверно по отношению к контролю ($p \leq 0,05$),

**достоверно по отношению к гепарину ($p \leq 0,05$).

Таблица 2

Время свертывания крови крыс после введения экстракта из листьев лещины обыкновенной в различных дозах, $M \pm m$ ($n = 6$)

Группа животных	Время свертывания крови, с
Интактный контроль	115,50 ± 2,95
Экстракт из листьев лещины, 30 мг/кг	172,50 ± 2,26*
Экстракт из листьев лещины, 60 мг/кг	231,34 ± 2,50*
Экстракт из листьев лещины, 90 мг/кг	219,17 ± 1,33*

Примечание. Здесь и в табл. 3: *достоверно по отношению к контролю ($p \leq 0,05$).

флавоноиды [10], которые широко известны своими антиоксидантными свойствами [11]. Согласно общепринятой точке зрения, антиоксидантное свойство флавоноидов основано на способности взаимодействовать со свободными радикалами, уменьшая интенсивность ПОЛ, таким образом стабилизируя мембранный комплекс клетки [11, 12]. Полученные результаты позволяют сделать вывод о выраженном мембраностабилизирующем действии густого экстракта из листьев лещины обыкновенной на модели спонтанного гемолиза эритроцитов.

Поскольку одним из ведущих симптомов тромбофлебита является воспали-

ние, целью дальнейшего этапа исследования было изучение влияния экстракта из листьев лещины на течение воспалительного процесса на классической модели карагенинового отека, в механизме развития которого участвуют простагландины, биогенные амины и кининовая система. Считают, что в первые 30–90 мин в развитии отека участвуют гистамин и серотонин, в интервале между 1,5–2,5 ч – кинины, а между 2,5–5,5 ч – простагландины [9]. Как видно из данных таблицы 4, в первый час исследования наблюдали достоверное уменьшение отека в группе животных, получавших исследуемый экстракт в дозах 60 и 90 мг/кг. Противовоспали-

Таблица 3

Результаты изучения мембраностабилизирующей активности густого экстракта из листьев лещины обыкновенной, n = 7

Группа животных	Доза	Степень гемолиза эритроцитов, %	Мембраностабилизирующая активность, %
Интактный контроль	–	12,80 ± 0,01	-
Экстракт из листьев лещины	30 мг/кг	3,85 ± 0,01*	69,92
Экстракт из листьев лещины	60 мг/кг	3,72 ± 0,01*	70,93
Экстракт из листьев лещины	90 мг/кг	6,95 ± 0,02*	45,7
Эскувит	10 мг/кг	4,49 ± 0,01*	64,92

Таблица 4

Показатели противовоспалительной активности густого экстракта из листьев лещины обыкновенной на модели карагенинового отека лапы у крыс, n = 6

Время наблюдения	Vo–Vк, у. е. (А, %)				
	Контрольная патология	Экстракт из листьев лещины, 30 мг/кг	Экстракт из листьев лещины, 60 мг/кг	Экстракт из листьев лещины, 90 мг/кг	Диклофенак, 8 мг/кг
Первый час	18,50 ± 2,81 -	18,86 ± 1,57** (4,94 %)	8,00 ± 1,73* (56,76 %)	8,43 ± 1,90 (54,43 %)	7,67 ± 0,81* (61,34 %)
Второй час	20,67 ± 3,20 -	19,57 ± 5,53 (5,32 %)	17,43 ± 1,70** (15,67 %)	17,28 ± 1,98** (16,40 %)	9,50 ± 2,35* (54,04 %)
Третий час	21,17 ± 3,43 -	20,00 ± 4,20 (5,53 %)	20,14 ± 2,19** (4,87 %)	20,71 ± 1,80** (2,17 %)	11,34 ± 1,50* (46,43 %)
Четвертый час	20,84 ± 1,33 -	17,43 ± 3,10 (16,36 %)	19,57 ± 0,98** (6,09 %)	18,57 ± 1,72 (10,89 %)	12,50 ± 1,64* (40,02 %)
Двадцать четвертый час	5,67 ± 1,03 -	4,86 ± 3,44 -	4,57 ± 1,13 (19,4 %)	4,71 ± 1,38 (19,2 %)	3,50 ± 1,37 (38,27 %)

*Примечание. *Достоверно по отношению к контролю (p ≤ 0,05), **достоверно по отношению к показателю группы диклофенака (p ≤ 0,05), А – антиэкссудативная активность,%; Vo–Vк, разница между объемом отека лапы и ее исходным размером, у. е.*

тельная активность экстракта в этих дозах составляла 56,76 и 54,43 % соответственно, достоверно не отличаясь в этот срок от эффекта диклофенака. Ко второму часу эксперимента наблюдалось уменьшение противовоспалительной активности экстракта в указанных дозах более чем в 3 раза по сравнению с препаратом сравнения. В течение последующих часов развития воспаления уменьшение отека пораженной конечности было незначительным (табл. 4).

У крыс, которым вводили экстракт в дозе 30 мг/кг, динамика развития воспалительного процесса не отличалась от нелеченных животных в течение всего эксперимента.

Итак, поскольку экстракт из листьев лещины в дозе 60 мг/кг и 90 мг/кг достоверно уменьшал отек лап крыс по сравнению с контрольной патологией в первые часы эксперимента, это может свидетельствовать о его влиянии на начальный этап воспаления, связанный с выделением гистамина и серотонина. Однако механизм противовоспалительного действия изучаемого экстракта, по-видимому, не связан с угнетением циклооксигеназной системы, поскольку активность на третий и четвертый час эксперимента (пик уровня простагландинов) не была достоверной относительно контрольной патологии ни в одной из опытных групп.

Выводы

1. Экстракт из листьев лещины обыкновенной увеличивает время свертывания крови в опытах *in vitro* и характеризуется высокой антикоагулянтной активностью в дозах 60 мг/кг и 90 мг/кг в опытах *in vivo*.
2. Установлено, что на модели спонтанного гемолиза эритроцитов экстракт из листьев лещины обыкновенной проявляет выраженное мембраностабилизирующее действие, эффективность экстракта в дозах 30 мг/кг и 60 мг/кг превысила эффективность препарата сравнения.
3. Экспериментально доказано, что на модели карагенинового отека лапы крыс экстракт из листьев лещины обыкновенной в дозах 60 мг/кг и 90 мг/кг проявляет активность на начальном этапе воспаления (выделение вазоактивных медиаторов), и не влияет на простагландиную фазу воспаления.
4. Скрининговые исследования антикоагулянтной, противовоспалительной и мембраностабилизирующей активности густого экстракта из листьев лещины обыкновенной позволили установить условно-терапевтическую дозу – 60 мг/кг, которая может быть использована для дальнейшего фармакологического изучения.

1. Bergan J. Therapeutic approach to CVH and its complications: Place of Daflon 500 mg. / J. Bergan, G. W. Schmid – Schonbein // *Angiology*. – 2001. – V. 52, supp. 1. – P. 43–47.
2. Покровский А. В. Диагностика и лечение варикозной болезни / А. В. Покровский, Е. Г. Градусов, Р. А. Бредихин. – Москва : РМАПО, 2013. – 125с.
3. Кириенко А. И. Фармакотерапия хронической недостаточности нижних конечностей / А. И. Кириенко, Р. А. Григорян // *Consilium medicum*. – 2000. – Т. 2, № 4. – С. 15–19.
4. Ganetsky V. Role of Novel and Emerging Oral Anticoagulants for Secondary Prevention of Acute Coronary Syndromes / V. Ganetsky, D. Hadley, T. Thomas // *Pharmacotherapy*. – 2014. – V. 34 (6). – P. 590–604.
5. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Magnoliaceae – Limnaceae. Ленинград, 1985. – 460 с.
6. Западнюк М. П. Лабораторные животные. Использование в эксперименте / М. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария. – Киев : Высшая школа, 1983. – 382 с.
7. Клиническая лабораторная диагностика: Справочник для врачей / В. В. Медведев, Ю. З. Волчек / Под ред. В. А. Яковлева. – Санкт-Петербург : Гиппократ, 2006. – 360 с.
8. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – 2 изд., перераб. и доп. – Минск : Беларусь, 1982. – С. 81–87.
9. Доклінічні дослідження лікарських засобів (метод. рекомендації). За ред. чл.-кор. НАМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.
10. Кількісний вміст флавоноїдів у рослинах роду лещина / Т. М. Гонтова, О. П. Хворост, В. В. Беліков [та ін.] // *Фармац. журн.* – 1995. – № 6. – С. 65–66.
11. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Тараховский Ю. С., Ким Ю. А., Абдралилов Б. С., Музафаров Е. Н.; [отв. ред. Е. И. Маевский]. – Пушино : Synchrobook, 2013. – 310 с.
12. Биофлавоноиды и их значение в ангиологии. Фокус на диосмин / В. Ю. Богачев, О. В. Голованова, А. Н. Кузнецов, А. О. Шекоян // *Ангиология и сосудистая хирургия*. – 2013. – Т. 19, № 1. С. 73–81.

Г. С. Каленіченко, Л. М. Малоштан

Скринінгове дослідження антикоагулянтної, мембраностабілізуючої та протизапальної активності густого екстракту з листя ліщини звичайної

Проведено скринінгові дослідження фармакологічної активності густого екстракту з листя ліщини звичайної. Досліджено антикоагулянтну, мембраностабілізуючу та протизапальну активності.

Визначено, що екстракт збільшує час згортання крові в дослідженні *in vitro* та проявляє виражену антикоагулянтну дію в дослідженні *in vivo* методом Бюркера. Встановлено виражену мембраностабілізуючу активність на моделі спонтанного гемолізу еритроцитів за Ягером, яка перевищила ефективність препарату порівняння. Доведено, що на моделі карагенінового набряку лап щурів густий екстракт з листя ліщини проявляє протизапальну активність на початковому етапі запалення (виділення вазоактивних медіаторів), і не впливає на простагландинову фазу запалення.

Отримані результати дозволили встановити умовно-терапевтичну дозу густого екстракту з листя ліщини звичайної, яка може бути використана для подальшого дослідження ефективності екстракту за умов експериментальної патології.

Ключові слова: екстракт з листя ліщини звичайної, лікарські рослини, фармакологічний скринінг

А. С. Каленіченко, Л. Н. Малоштан

Скрининговое исследование антикоагулянтной, мембраностабилизирующей и противовоспалительной активности густого экстракта из листьев лещины обыкновенной

Проведены скрининговые исследования фармакологической активности густого экстракта из листьев лещины обыкновенной. Исследована антикоагулянтная, мембраностабилизирующая и противовоспалительная активности.

Определено, что экстракт увеличивает время свертывания крови в исследовании *in vitro* и проявляет выраженное антикоагулянтное действие в исследовании *in vivo* методом Бюркера. Установлена выраженная мембраностабилизирующая активность на модели спонтанного гемолиза эритроцитов по Ягерю, которая превысила эффективность препарата сравнения. Доказано, что на модели карагенинового отека лап крыс густой экстракт из листьев лещины проявляет противовоспалительную активность на начальном этапе воспаления (выделение вазоактивных медиаторов), и не влияет на простагландиновую фазу воспаления.

Полученные результаты позволили установить условно-терапевтическую дозу густого экстракта из листьев лещины обыкновенной, которая может быть использована в дальнейшем исследовании эффективности экстракта в условиях экспериментальной патологии.

Ключевые слова: экстракт из листьев лещины обыкновенной, лекарственные растения, фармакологический скрининг

A. S. Kalenichenko, L. N. Maloshtan

Screening study of anticoagulant, membrane stabilizing and anti-inflammatory activity of the thick extract from the leaves of corylus avellana

A screening research of the pharmacological activity of the thick extract from the leaves of *Corylus avellana* has been conducted. It has been studied anticoagulant, anti-inflammatory and membrane stabilizing activities.

It has been determined that the extract increases the clotting time in experiment *in vitro* and shows a pronounced anticoagulant activity in experiment *in vivo* by Burker. It was determined that on the model of spontaneous hemolysis of red blood cells by Jager, the extract has membrane stabilizing activity that exceeded the efficacy of comparative drug. It has been proved that, on the model of karrageenan edema on rats, the thick extract of leaves of *Corylus avellana* exhibits anti-inflammatory activity in the initial stage of inflammation (secretion of vasoactive mediators), and does not affect prostaglandin phase of inflammation.

The results allowed to establish conditionally-therapeutic dose of thick extract from the leaves of *Corylus avellana*, that can be used for further research of the efficiency of the extract in experimental pathology.

Key words: extract from the leaves of *Corylus avellana*, medicinal plants, pharmacological screening

Надійшла: 28 січня 2016 р.

Контактна особа: Каленіченко Ганна Станіславівна, аспірант, кафедра фізіології та анатомії людини, Національний фармацевтичний університет, буд. 12, вул. Мельникова, м. Харків, 61000. Тел.: + 38 0 95 327 60 32. Електронна пошта: anna.geiderikh@list.ru тел.