

Краткие сообщения

© Коллектив авторов, 2020
УДК 615:616.33:616.34:615.243

Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Стрелкова Л.Б., Курманов Р.К., Шейченко О.П.

Изучение противовоспалительной активности экстракта змееголовника молдавского

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»,
117216, г. Москва, Россия, ул. Грина, д. 7 стр. 1

Змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.) в народной медицине используется в качестве противовоспалительного, ранозаживляющего, отхаркивающего и седативного средства. В ФГБНУ ВИЛАР разработан змееголовника молдавского травы экстракт сухой под условным названием «Люкатыл» (сумма фенольных соединений 64,12% в пересчёте на цинарозид). **Цель работы** – изучение острой токсичности и противовоспалительной активности экстракта змееголовника для разработки на его основе лекарственного препарата. **Методика.** Проведено определение параметров острой токсичности и противовоспалительной активности экстракта. При изучении острой токсичности экстракта по методу Кербера использованы белые нелинейные мыши-самцы в количестве 30 особей. «Люкатыл» вводили животным внутрижелудочно в дозах 500, 1000, 1500 и 2000 мг/кг. Для выявления противовоспалительной активности экстракта змееголовника молдавского использована *in vitro* ферментная биотест-система на основе индуцибельной NO-синтазы. Для выявления противовоспалительной активности экстракта *in vivo* использованы нелинейные мыши-самцы. Оценку влияния экстракта в дозе 200 мг/кг на экссудативную стадию воспаления проводили на модели 1% формалинового отёка. В качестве препарата сравнения использовали индометацин (5 мг/кг). Формалиновый отёк вызывали однократным субплантарным введением под апоневроз задней правой лапки мыши 0,05 мл 1% формалина в качестве флогогенного агента. Величину отёка определяли по разнице в массе лапок контрольных и опытных животных и рассчитывали процент снижения степени отёка. **Результаты.** При однократном введении экстракт «Люкатыл» не приводил к гибели животных, изменения внешнего вида и поведенческих реакций мышей не наблюдалось. В соответствии с классификацией токсичности химических веществ по ГОСТ 12.1.007-76 «Люкатыл» является малотоксичным веществом. *In vitro* установлена высокая противовоспалительная активность экстракта, при этом остаточная активность iNOS снижалась до 25%. Экстракт в дозе 200 мг/кг *in vivo* обладал статистически значимым противовоспалительным эффектом. Он подавлял развитие экссудативной фазы воспаления на 33,7%, по сравнению с контрольной группой животных, уступая противовоспалительному эффекту индометацина. **Заключение.** Змееголовника молдавского травы экстракт сухой под условным названием «Люкатыл» является малотоксичным веществом, обладает выраженным противовоспалительным эффектом в опытах *in vitro*, *in vivo* и является перспективным объектом для дальнейшего фармакологического изучения в качестве противовоспалительного лекарственного средства.

Ключевые слова: змееголовника молдавского травы экстракт сухой; экссудативная стадия воспаления, противовоспалительная активность; биотест-системы, острая токсичность.

Для цитирования: Курманова Е.Н., Ферубко Е.В., Стрелкова Л.Б., Курманов Р.К., Шейченко О.П. Изучение противовоспалительной активности экстракта змееголовника молдавского. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2020; 64(1): 108-112.

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.108-112

Для корреспонденции: Курманова Елена Николаевна, e-mail: kurmanova1968@yandex.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.04.2019

Принята к печати 16.01.2020

Опубликована 25.02.2020

Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Strelkova L.B., Kurmanov R.K., Sheichenko O.P.

Anti-inflammatory activity of the moldavian dragonhead extract

All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Grina Str. 7, Bld. 1, Moscow 117216, Russia

Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) is used in traditional medicine as an anti-inflammatory, wound-healing, expectorant, and sedative means. In our Institute, a Moldavian dragonhead herb dry extract (total phenolic content, 64.12% in

cynaroside equivalent) was developed and conventionally named Lyukatil. **Objective.** To study acute toxicity and anti-inflammatory activity of the dragonhead extract for developing a drug based on this extract. **Method.** Parameters of acute toxicity and anti-inflammatory activity of the extract were assessed. The study of acute toxicity of the extract was performed using the Kerber method on male white mongrel mice (n=30). Lyukatil was administered to the animals intragastrically at doses of 500 mg/kg, 1000 mg/kg, 1500 mg/kg, and 2000 mg/kg. Anti-inflammatory activity of the Moldavian dragonhead extract was determined *in vitro* using an enzyme Biotest system based on inducible NO synthase. Mongrel male mice were used to study the anti-inflammatory activity of the extract *in vivo*. The effect of the extract at a dose of 200 mg/kg on the exudative phase of inflammation was evaluated on a model of 1% formalin-induced edema. Indomethacin 5 mg/kg was used as a reference drug. Formalin edema was induced by a single subplantar injection of 0.05 ml of 1% formalin as a phlogogenic agent under the aponeurosis of the right hind leg. The degree of edema was determined by the difference in leg weights in control and experimental animals; then the decrease in edema was calculated in per cent. **Results.** A single administration of the extract Lyukatil did not cause death of animals, changes in the appearance or in behavioral responses, shortness of breath, or drowsiness. In accordance with the toxicity classification for chemical substances as per GOST Standard 12.1.007-76, Lyukatil is a low-toxic substance. The extract at a dose of 200 mg/kg exerted a significant anti-inflammatory effect as shown by suppression of the exudative phase of formalin-induced inflammation by 33.7% compared to the control group. However, this effect was inferior to the anti-inflammatory effect of indomethacin. **Conclusions.** The Moldavian dragonhead herb dry extract under the conventional name of Lyukatil is a low-toxic substance that has a significant anti-inflammatory effect both *in vitro* and *in vivo* and is a promising target for further pharmacological studies as an anti-inflammatory drug.

Keywords: змееголовника молдавского травы экстракт сухой; экссудативная стадия воспаления, противовоспалительная активность; биотест-системы, острая токсичность.

For citation: Kurmanova E.N., Ferubko E.V., Strelkova L.B., Kurmanov R.K., Sheichenko O.P. Anti-inflammatory activity of the moldavian dragonhead extract. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(1): 108-112. (in Russian).

DOI: 10.25557/0031-2991.2020.01.108-112

For correspondence: Kurmanova E.N. Researcher, Department of Experimental and Clinical Pharmacology, e-mail: kurmanova1968@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Ferubko E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1949-2597>

Strelkova L.B., <https://orcid.org/0000-0002-9199-3858>

Received 15.04.2019

Accepted 16.01.2020

Published 25.02.2020

Введение

Воспаление – важный патогенетический компонент многих заболеваний и его фармакологическая коррекция является актуальной проблемой современной медицины. Поражение суставов и боли в спине являются частыми состояниями, с которыми больные обращаются к врачу и которые приводят к инвалидизации пациентов [1]. При заболеваниях, в основе которых лежит воспаление, наряду с кортикостероидными, иммунодепрессивными и нестероидными противовоспалительными средствами могут успешно использоваться и препараты из лекарственных растений, обладающие противовоспалительными свойствами. Змееголовник молдавский (*Dracocephalum moldavica* L.) издавна используется в народной медицине в качестве противовоспалительного, ранозаживляющего, отхаркивающего и седативного средства. В надземной части этого растения обнаружены эфирные масла, флавоно-

иды, тритерпеновые кислоты, оксикоричные кислоты (хлорогеновая, феруловая, цикориевая) [2]. В ФГБНУ ВИЛАР более 10 лет проводятся комплексные исследования по разработке оригинального лекарственного средства на основе змееголовника молдавского. Это растение введено в культуру, разработана агротехнология, создан новый сорт «Нежность» [3]. В отделе фитохимии разработан способ получения змееголовника молдавского травы экстракта сухого под условным названием «Люкати́л» (сумма фенольных соединений 64,12% в пересчёте на цинарозид).

Цель исследования – изучение острой токсичности и противовоспалительной активности экстракта для разработки лекарственного препарата на его основе.

Методика

В отделе экспериментальной и клинической фармакологии проведено определение параметров острой

токсичности и противовоспалительной активности змееголовника молдавского травя экстракта сухого под условным названием «Люкати́л». Эксперименты проведены в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Москва, 2012), Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Протокол экспериментов одобрен биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР. Производитель животных – Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБТ» ФМБА России (Московская область). Животные содержались в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе.

Определение параметров острой токсичности при однократном внутрижелудочном введении экстракта по методу Кербера [4]. В эксперименте по изучению острой токсичности использованы белые нелинейные мыши самцы в количестве 30 особей, массой 20–22 г, в группах по 6 животных. Сухой экстракт змееголовника молдавского «Люкати́л» растворяли в дистиллированной воде и вводили животным внутрижелудочно в дозах 500, 1000, 1500, 2000 мг/кг. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду в эквивалентном объёме. Наблюдение за состоянием подопытных животных проводили в течение 14 сут, оценивали изменение внешнего вида и поведенческие реакции мышей, следили за двигательной активностью, реакцией на внешние раздражители и сроками гибели.

Разработка специфических биотест-систем. В ФГБНУ ВИЛАР в течение ряда лет ведется разработка приоритетного направления создания молекулярных специфических биотест-систем *in vitro*, проявляющих высокую избирательность к биологически активным веществам (БАВ), обладающим соответствующими фармакологическими свойствами. Разработаны и запатентованы оригинальные биотест-системы на основе ферментов антиоксидантной защиты (каталазы, глутатионредуктазы), воспаления (индуцибельной NO-синтазы), иммунной системы (НАДФН-оксидазы), ферментов биотрансформации – системы цитохрома P₄₅₀ и глутатионтрансферазы. Оригинальные биотест-системы обладают помимо высокой избирательности информативностью, чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, быстротой достижения результатов, что позволяют оптимизировать доклинические исследования.

Для оптимизации выявления биологической активности экстракта змееголовника молдавского используется ферментная биотест-система на основе индуди-

бельной NO-синтазы (iNOS), которая входит в состав Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС) ФГБНУ ВИЛАР [5]. Исследован водный раствор экстракта змееголовника молдавского в исходной концентрации 2 мг/мл.

При определении скорости ферментативной реакции, катализируемой индуцибельной NO-синтазой, концентрация экстрактов змееголовника составляла 13,3 мкг на 1 мл реакционной пробы. Скорость iNOS-реакции определяли на двухлучевом спектрофотометре «Shimadzu UV1800» (Япония) при длине волны 340 нм используя программу кинетических исследований.

При изучении противовоспалительной активности экстракта *in vivo* использованы белые нелинейные мыши самцы в количестве 30 особей, массой 19–20 г. Оценку влияния экстракта на течение экссудативной стадии воспаления проводили на модели 1% формалинового отёка. Животные были разделены на 3 группы: 1-я группа – формалиновый отёк без лечения (контроль), 2-я – формалиновый отёк + экстракт змееголовника (200 мг/кг) и 3-я группа – формалиновый отёк + препарат сравнения. В каждой группе было по 10 крыс. Экстракт змееголовника вводили внутрижелудочно (200 мг/кг) в течение 3 сут до введения и через 1 ч после введения формалина. В качестве препарата сравнения использовано известное противовоспалительное средство индометацин (таблетки 25 мг «Софарма», Болгария) в расчетной дозе 5 мг/кг. Индометацин вводили внутрижелудочно по аналогичной схеме. Формалиновый отёк вызывали однократным субплантарным введением под апоневроз задней правой лапки мыши 0,05 мл 1% формалина в качестве флогогенного агента [6]. Через 3 ч после введения формалина (на пике воспаления) животных подвергали эвтаназии в CO₂ камере и регистрировали прирост объёма экссудата ампутированных конечностей мышей (мг). Величину отёка определяли по разнице в массе лапок у контрольных и опытных животных и рассчитывали выраженность отека в процентах по формуле:

$$\text{выраженность отёка (\%)} = \frac{P_k - P_0}{P_k} \times 100$$

где P_k – разность масс лапок с отёком и без отёка у животных контрольной группы; P₀ – разность масс лапок с отёком и без отёка у животных опытной группы.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (Stat Soft, США). При исследовании *in vitro* для нормального распределения величин статистическую значимость различий определяли по t-критерию Стьюдента. В опытах *in vivo* значимость различий между группами оценивали по критерию Манна – Уитни.

Различия статистически достоверны по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

Результаты

Изучение острой токсичности препарата «Люкати́л» in vivo. При однократном введении сухого экстракта змееголовника молдавского «Люкати́л» (сумма фенольных соединений 64,12% в пересчёте на цинарозид) в дозах 500, 1000, 1500, 2000 мг/кг не наблюдалось гибели животных, изменения их внешнего вида, поведенческих реакций, а также отсутствовала одышка и сонливость. Животные были активны, охотно поедали корм, адекватно реагировали на внешние раздражители. При изучении острой токсичности препарата не установлены показатели ЛД₅₀, так как внутрижелудочное введение исследуемых доз не приводило к гибели животных. В соответствии с классификацией токсичности химических веществ по ГОСТ 12.1.007-76 сухой экстракт змееголовника молдавского «Люкати́л» относится к малотоксичным веществам [7].

Противовоспалительная активность змееголовника молдавского in vitro. Результаты исследований приведены в **таблице 1**.

Для оценки противовоспалительной активности экстракта змееголовника молдавского с применением *iNOS* тест-системы определяли скорость ферментативной *iNOS*-реакции до (контроль) и после добавления в реакционную пробу исследуемого образца (опыт) в условиях *in vitro*. При анализе полученных данных уста-

новлена высокая противовоспалительная активность экстракта змееголовника молдавского, при этом остаточная активность *iNOS* снижалась до 25%. Таким образом, установлено, что образец экстракта змееголовника молдавского в условиях опытов *in vitro* обладает выраженной противовоспалительной активностью.

Влияние препарата «Люкати́л» на выраженность формалинового отека. Результаты изучения влияния сухого экстракта змееголовника молдавского на выраженность экссудативной фазы воспаления представлены в **таблице 2**.

Данные, представленные в **таблице 2**, свидетельствуют о том, что исследуемый экстракт (200 мг/кг) при 3-х-суточном введении обладает статистически значимым противовоспалительным эффектом. Он подавляет развитие экссудативной фазы, вызванной введением 1% раствора формалином, на 33,7% по сравнению с контролем, но уступал противовоспалительному эффекту индометацина, который подавлял развитие экссудативной фазы, вызванной формалином, на 42,8%.

Заключение

Таким образом, змееголовника молдавского травы экстракт сухой под условным названием «Люкати́л» является малотоксичным веществом, обладающим выраженным противовоспалительным эффектом в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Препарат является перспек-

Таблица 1

Влияние экстракта змееголовника молдавского на скорость ферментативной реакции, катализируемой индуцибельной NO-синтазой

Вариант опыта	Скорость <i>iNOS</i> –реакции	
	нмоль НАДФН/ мин. мг белка	Опыт/ контроль (%)
Контроль (без препарата)	4,384 ± 0,087	100
экстракт змееголовника молдавского	1,096 ± 0,064*	25

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

Таблица 2

Изучение влияния змееголовника молдавского травы экстракта сухого «Люкати́л» на течение экссудативной фазы воспаления у мышей при 3-х-суточном введении

Препарат (n=10)	Доза, мг/кг	Прирост объема экссудата на пике воспаления, мг	Противовоспалительный эффект (% к контролю)
Контроль (вода дистиллированная)	–	184,2±4,1	–
Люкати́л	200 мг/кг	122,1±1,84*	33,7
Индометацин	5 мг/кг	105,38±2,3*	42,8

Примечание. * – различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

тивным объектом для дальнейшего изучения в качестве противовоспалительного лекарственного средства.

Исследования были проведены по теме: «Проведение доклинических исследований отдельных фракций, субстанций и лекарственных препаратов из лекарственного растительного сырья», шифр темы № 0576-2019-0009/

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – Курманова Е.Н., Ферубко Е.В.

Сбор и обработка материала – Курманов Р.К., Стрелкова Л.Б., Шейченко О.П.

Статистическая обработка – Курманова Е.Н., Ферубко Е.В.

Написание текста – Курманова Е.Н.

Редактирование текста – Ферубко Е.В.

Литература

1. Чичасова Н.В. Место медленнодействующих препаратов в рациональной терапии деформирующего остеоартроза. *Consilium Medicum*. 2005; 8: 634-8.
2. Соколов П.Д. *Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Hippuridaceae-Lobeliaceae*. СПб; Наука, 1991.
3. Тоцкая С.А. Станишевская И.Е., Хазиева Ф.М., Сидельников Н.И. Приёмы повышения урожайности и качества семян змеголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L.) *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2012; 7: 47-50.
4. Сернов Л.Н., Гацура В.В. *Элементы экспериментальной фармакологии*. М.; Медицина, 2000.
5. Стрелкова Л.Б., Кондакова Н.В., Дубинская В.А., Быков В.А. Индуцибельная NO-синтаза как ферментная биотест-система

ма для выявления веществ с противовоспалительными свойствами *in vitro*. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2013; 11: 75–80.

6. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Часть первая. М.; Гриф и К, 2012.
7. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Хим.-фарм. журн.* 2003; 37(3): 32-4.

References

1. Chichasova N. In. The place of slow-acting drugs in the rational therapy of deforming osteoarthritis. *Consilium Medicum*. 2005; 8: 634-8. (in Russian)
2. Sokolov P.D. *Plant resources of the USSR. Flowering plants, their chemical composition, use. Families Hippuridaceae-Lobeliaceae. [Rastitel'nye resursy SSSR: Tsvetkovye rasteniya, ikh khimicheskiiy sostav, ispol'zovanie; Semeystva Hippuridaceae-Lobeliaceae]*. Sankt Peterburg; Nauka, 1991. (in Russian)
3. Tockaya S.A., Stanishevskaya I.E., Hazieva F.M., Sidelnikov N.I. Methods of increase of productivity and quality of seeds of a dragonhead Moldavian (*Dracocephalum moldavica* L.) *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2012; 7: 47-50. (in Russian)
4. Sernov L.N., Gatsura V.V. *Elements of experimental pharmacology [Elementy eksperimental'noy farmakologii]*. Moscow; Meditsina, 2000. (in Russian)
5. Strelkova, L.B., Kondakova N.V., Dubinskaya V.A., Bykov V.A. Inducible NO-synthase as an enzyme Biotest system for the detection of substances with anti-inflammatory properties *in vitro*. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2013; (11): 75-80
6. *Guide to carrying out preclinical researches of pharmaceuticals. Part one. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. Chast' pervaya. Moscow; Grif i K; 2012. (in Russian)
7. Berезovskaya I.V. Classification of chemicals according to the parameters of acute toxicity in parenteral administration. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2003; 37(3): 32-4.

Сведения об авторах:

Курманова Елена Николаевна, науч. сотр. отдела экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений», e-mail: kurmanova1968@yandex.ru;

Ферубко Екатерина Владимировна, канд. мед. наук, зав. отделом экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

Стрелкова Людмила Борисовна, канд. мед. наук, вед. науч. сотр. отдела медико-биологических проблем НИЦ БМТ ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

Курманов Ришат Каримович, науч. сотр. отдела экспериментальной и клинической фармакологии Центра медицины ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений»;

Шейченко Ольга Петровна, канд. хим. наук, зав. отделом фитохимии ФГБНУ «Всероссийский НИИ лекарственных и ароматических растений».