



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 02.07.2021)

Пошлина: Возможность восстановления: нет.

(21)(22) Заявка: [2014111633/15](#), 26.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.03.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 26.03.2014

(45) Опубликовано: [27.07.2015](#) Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: АЗАРОВА О.В. и др.
Противовоспалительная активность полифенольных комплексов клеточных культур дальневосточных растений //Бюллетень СО РАМН, том 30,

Адрес для переписки:

634028, г.Томск, пр. Ленина, 3, НИИФирМ

(72) Автор(ы):

Масная Наталья Владимировна (RU),
Шукшина Ольга Геннадьевна (RU),
Шерстобоев Евгений Юрьевич (RU),
Тобольжина Светлана Александровна (RU),
Исайкина Надежда Валентиновна (RU),
Калинкина Галина Ильинична (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга" (RU),
Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

(54) СРЕДСТВО, ОБЛАДАЮЩЕЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ ДЕЙСТВИЕМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к средству, обладающему противовоспалительным действием. Применение полифенольного комплекса, полученного путем экстракции измельченных плодов рябины обыкновенной 40% спиртом этиловым с последующим сгущением полученного водно-спиртового экстракта, добавлением 95% спирта этилового, центрифугированием осадка, фильтрованием и сгущением надосадочной жидкости при определенных условиях, в качестве средства, обладающего противовоспалительным действием. Вышеописанный полифенольный комплекс обладает выраженным противовоспалительным действием. 1 ил., 9 табл., 7 пр.

Изобретение относится к медицине, конкретно к фармакологии, и касается средства, которое может быть использовано при лечении воспалительных заболеваний различной этиологии.

На сегодняшний день ассортимент официальных противовоспалительных фитосредств недостаточен для решения проблемы терапии воспалительных заболеваний. Сложность заключается в том, что, во-первых, воспаление - весьма динамичный процесс с множеством альтернативных и перекрещивающихся путей [1], на которые повлиять системно достаточно сложно. Во-вторых, длительное назначение синтетических противовоспалительных препаратов способствует возникновению побочных эффектов [2]. Решающим критерием при выборе противовоспалительных препаратов является не только их эффективность, но и безопасность. Поэтому альтернативой синтетическим препаратам с противовоспалительной активностью могут служить препараты растительного происхождения, которые обладают широким спектром биологической активности, мягким воздействием на организм, хорошей переносимостью, отсутствием токсических проявлений при длительном применении и ограниченным диапазоном противопоказаний [2]. Настойка эхинацеи - наиболее широко используемый в настоящее время растительный препарат, обладающий иммуностимулирующим и противовоспалительным свойствами. Известно, что биологически активные вещества (БАВ), входящие в состав эхинацеи, способны снижать синтез провоспалительных цитокинов, угнетать липоксигеназный и циклооксигеназный пути метаболизма арахидоновой кислоты, а также могут выступать в роли антиоксидантов и тем самым уменьшать процессы воспаления в тканях [3, 4, 5]. В качестве препарата сравнения мы использовали Настойку эхинацеи пурпурной («ГаленоФарм», г. Санкт-Петербург, разрешена к применению на территории России, рег. №000167.01-2000). Однако ее недостатком является то, что это концентрированное извлечение из лекарственного

растительного сырья, комплекс биологически активных компонентов, для получения необходимого лечебного эффекта которых требуется тщательный подбор и корректировка дозы и длительность применения, возможны аллергические реакции. К тому же спиртовые настойки могут являться противопоказанием для лиц, управляющих транспортными средствами, лиц, имеющих алкогольную зависимость, детей, подростков.

Перспективными БАВ, обладающими противовоспалительными свойствами, могут являться полифенольные соединения (ПФС), выделенные из плодов рябины обыкновенной. Благодаря богатому комплексу БАВ плоды рябины обыкновенной широко применяются в народной медицине при воспалительных заболеваниях печени, желчного пузыря, почек, соединительной ткани [2, 6]. Последние исследования механизмов действия природных полифенолов показали, что их фармакологическая активность обусловлена способностью влиять на активность многих регуляторных белков, тем самым снижать выраженность воспалительной реакции [7].

Задачей изобретения является расширение арсенала фитосредств, обладающих противовоспалительным действием.

Поставленная задача решается *in vivo* путем внутрижелудочного применения 5-дневным курсом в дозе 50 мг/кг полифенольного комплекса (ПФК), выделенного из водно-спиртового экстракта плодов рябины обыкновенной путем очистки водно-спиртового экстракта рябины обыкновенной от белково-полисахаридного комплекса 95% этиловым спиртом. *In vitro* - путем добавления ПФК рябины обыкновенной в дозах 50 и 500 мкг/мл в культуры мононуклеаров периферической крови доноров-добровольцев с дальнейшей оценкой выработки противовоспалительных цитокинов.

По данным литературы плоды рябины содержат следующие группы БАВ: полифенольный комплекс - флавоноиды, фенолокислоты, антоцианы, катехины, дубильные вещества; каротиноиды, полисахариды (пектиновые вещества) и свободные сахара, витамин С, органические кислоты и др. [8, 9]. Основными фенольными соединениями плодов рябины обыкновенной являются рутин, цианидин-3-о-глюкозид и хлорогеновая кислота. Именно эти вещества обладают выраженной противовоспалительной и антиоксидантной активностью [8].

ПФС обладают широким спектром фармакологической активности - антиоксидантное, антигипоксическое, противовирусное, противоопухолевое действие [10, 11]. Они не вызывают привыкания, эффекта «отмены препарата» и могут применяться в течение длительного времени. Биологическая активность ПФС позволяет применять их и в качестве лекарственных средств.

Основным механизмом противовоспалительного действия нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) является угнетение циклооксигеназы (ЦОГ) - ключевого фермента, принимающего участие в превращении арахидоновой кислоты в эндопероксиды, из которых синтезируются простагландины и тромбоксан. Простагландины являются медиаторами и модуляторами воспаления, болевого синдрома и лихорадки. Ингибирование ЦОГ резко сокращает уровень простагландинов, ответственных за основные симптомы воспаления: отек, расширение сосудов, жар, боль [12].

Высокая противовоспалительная эффективность полифенолов объясняется множеством «точек приложения» их действия к развивающемуся процессу воспаления; считается, что одними из главных механизмов являются ингибирование провоспалительных ферментов (ЦОГ, липоксигеназы, НАДФ-Н-оксидазы и фосфолипазы А₂) [13] и воздействие на внутриклеточные сигнальные молекулы, приводящее к снижению выработки провоспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IFN γ и TNF- α [11]. Наиболее близким аналогом предложенного средства являются средства растительного происхождения «Камадол», «Колхури», «Каланхин». Однако известные средства в основном являются суммарными лекарственными средствами, для получения необходимого лечебного эффекта которых требуется тщательный подбор и корректировка дозы, длительность применения используемого препарата. На данные препараты (их компоненты) возможны аллергические реакции. В случае использования водно-спиртовых настоек и экстрактов имеются противопоказания для лиц с непереносимостью алкоголя, лиц, требующих повышенного внимания на рабочих местах.

Для повышения эффективности лечения и уменьшения риска развития побочных эффектов предлагается средство, в котором воздействие усиливается за счет применения ПФК официального лекарственного сырья, выделенного из водно-спиртового экстракта плодов рябины обыкновенной путем очистки от белково-полисахаридного комплекса 95% этиловым спиртом.

Технический результат заключается в создании нового биоактивного средства, обладающего противовоспалительным эффектом на основе фармакологически активных веществ из плодов рябины обыкновенной.

Новым в предлагаемом изобретении для получения указанного результата является применение в качестве противовоспалительного средства ПФК, выделенного из

водно-спиртового экстракта плодов рябины обыкновенной путем очистки от белково-полисахаридного комплекса 95% этиловым спиртом, в дозе 50 мг/кг курсом 5 дней *in vivo* и *in vitro* в дозах 50 и 500 мкг/мл.

Изобретение будет понятно из следующего описания и приложенного к нему рисунка. На рис.1 изображена схема технологического процесса получения 40% жидкого экстракта плодов рябины обыкновенной.

Для установления противовоспалительных свойств ПФК рябины обыкновенной было изучено их курсовое влияние (в течение 5 дней) на клеточный ответ мышей линии СВА/СaLac. А также были проведены тесты *in-vitro* для изучения влияния ПФК рябины обыкновенной на синтез цитокинов мононуклеарами периферической крови здоровых доноров-добровольцев.

ПФК плодов рябины обыкновенной выделяли из водно-спиртового экстракта плодов рябины обыкновенной путем очистки от белково-полисахаридного комплекса 95% этиловым спиртом.

Пример 1. Получение полифенольного комплекса (ПФК)

1. Получение жидкого 40% экстракта плодов рябины обыкновенной

Для получения 40% экстракта использовали официальное лекарственное растительное сырье (ЛРС), собранное в августе 2012 года в окрестностях города Томска.

40% жидкий экстракт плодов рябины получали в лаборатории фармацевтической технологии НОЦ «Фармация» методом дробной ремацерации с динамизацией процесса [14]. Для получения экстракта использовали лабораторный реактор с паровой рубашкой («Radleys», Германия), подключенный к погруженному циркуляционному блоку регулирования температуры «МО1» («Термэкс», Россия), верхнеприводной мешалке RZR 2020 («Heidolph», Германия) и шариковому холодильнику.

Экстракт готовили в соотношении 1:5 на 40%-ном этиловом спирте и в ходе экстрагирования получили 500 мл жидкого экстракта. Схема технологического процесса представлена на рисунке 1. Сухой остаток жидкого экстракта определяли при помощи весового влагомера MS-70 («AND», Япония).

Описание схемы технологического процесса средства, обладающего противовоспалительным действием

1. Подготовка ЛРС

Плоды рябины измельчали при помощи измельчителя и отделяли от пыли при помощи сита с $d=0,25$ мм. Измельченное сырье просеивали через сито с $d=5$ мм. Из фракции сырья с размером частиц 5 мм при помощи электронных весов HL-200 («AND», Япония) отвешивали три навески сырья массой по 100,0 г.

2. Подготовка экстрагента

Рассчитывали необходимое количество исходного этанола и воды. Смешивали спирт и воду. Спирта 96,5% - 440,2 мл, воды очищенной - 653,5 мл.

3. Получение экстракта

Экстракт получали в лаборатории фармацевтической технологии НОЦ «Фармация». Для получения экстракта использовали лабораторный реактор с паровой рубашкой («Radleys», Германия), подключенный к погружному циркуляционному блоку регулирования температуры «МО1» («Термэкс», Россия), верхнеприводной мешалке RZR 2020 («Heidolph», Германия) и шариковому холодильнику.

3.1. Загрузка

В лабораторный реактор загружали 100,0 г ЛРС и 640,5 мл 40% этанола. На блоке регулирования температуры выставляли температуру для экстрагирования 80°C. Верхнеприводную мешалку подсоединяли к реактору.

3.2. Настаивание

Лабораторный реактор оставляли при температуре 80°C и интенсивном перемешивании на 1 час.

3.3. Мацерация

Через 1 час экстрагирования мешалку и блок регулирования температуры отключали от сети. Открыв кран реактора, спускали рабочий объем реактора в химический стакан. Одновременно сверху в реактор подавали 140,5 мл свежего экстрагента. Источенное сырье отжимали и далее его не использовали.

Стадии загрузка - мацерация повторяли еще 2 раза. Для этого каждый раз в реактор загружали 100,0 г свежего сырья. В качестве экстрагента использовали ранее полученный экстракт. В ходе экстрагирования получили 500 мл экстракта.

4. Отстаивание

Для очистки от сопутствующих веществ проводили отстаивание экстракта в течение 3 суток при температуре 8°C.

5. Процеживание

Отстоявшийся экстракт фильтровали через несколько слоев марли.

6. Стандартизация

6.1. Органолептический контроль:

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)



6.2. Определение сухого остатка

Содержание сухого остатка в жидком экстракте плодов рябины обыкновенной составило 18,25%.

6.3. Качественное обнаружение и количественное определение основных БАВ жидкого экстракта плодов рябины обыкновенной.

6.3.1. Качественное обнаружение БАВ.

Для определения качественного состава БАВ из водно-спиртового экстракта под вакуумом отгоняли спирт. Сгущенный экстракт разводили горячей водой очищенной, взбалтывали и осадок отфильтровывали. Для разделения сложных смесей веществ фильтрата применяли методы избирательной экстракции, используя в качестве экстрагентов гексан, хлороформ, этилацетат и н-бутанол. Таким образом нами было получено 4 фракции: гексановая (ГФ), хлороформная (ХФ), этилацетатная (ЭАФ) и бутанольная (БФ).

Из полученных фракций под вакуумом на роторной установке отгоняли органические растворители. Остаток экстрактивных веществ растворяли в 95% спирте этиловом и анализировали с применением методов одномерной хроматографии на бумаге (БХ) и в тонком слое сорбента (ТСХ «Сорбфил») параллельно с известными веществами - свидетелями в различных системах растворителей (н-бутанол - уксусная кислота - вода 4:1:2, 4:1:5; 15-30% уксусная кислота). Обнаружение веществ проводили в фильтрованном УФ-свете при длине волны 254 нм до и после обработки хроматограмм 2% этанольным раствором хлорида алюминия [15, 16, 17]. Результаты определения представлены в таблице 2.

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)



Таким образом, качественный состав экстракта плодов рябины обыкновенной представлен флавоноидами (кверцетинном и рутином), фенолокислотами (ФК) (кофейной, п-кумаровой, хлорогеновой, феруловой и ванилиновой) и антоцианами (цианид-3-О-глюкозид).

6.3.2. Количественное определение БАВ в водно-спиртовом экстракте рябины

Нами было определено количественное содержание флавоноидов, ФК, антоцианов и свободных сахаров (табл.3).

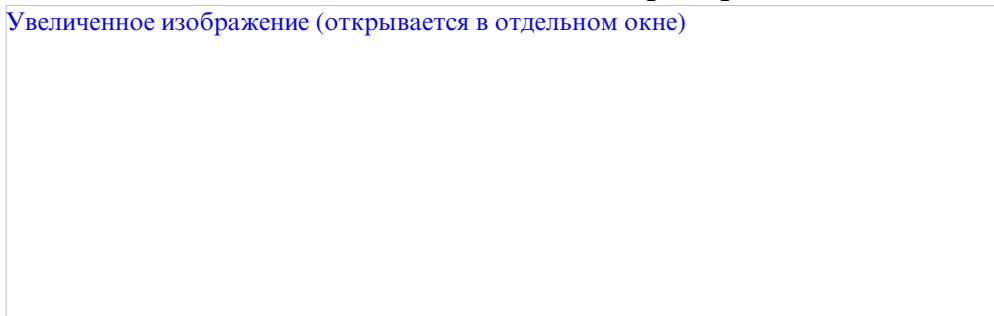
Сумму флавоноидов в пересчете на рутин определяли спектрофотометрическим методом с использованием комплексообразующей реакции с алюминия хлоридом [9, 18].

Количественное содержание суммы ФК кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту определяли методом прямого спектрофотометрического анализа водно-спиртового экстракта [19].

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-гликозид определяли спектрофотометрическим методом по собственной окраске в видимой области [20].

Количественное содержание суммы свободных сахаров в пересчете на глюкозу определяли спектрофотометрическим методом, в основе которого лежит цветная реакция моносахаридов с пикриновой кислотой с образованием аминопикриновой кислоты в результате восстановления сахаром группы NO_2 в NH_2 [21].

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)



2. Выделение ПФК из водно-спиртового экстракта плодов рябины обыкновенной

Полученный водно-спиртовой экстракт сгущали до $\frac{1}{2}$ объема (до 250 мл) на ротационном испарителе Hei - VAP Value, Hei - VAP Advantage («Heidolph», Германия). Сгущенный экстракт помещали в коническую колбу на 2000 мл и медленно при помощи магнитной мешалки добавляли в колбу 95% этиловый спирт в соотношении 1:3 (750 мл) и оставляли на 12 часов в темном прохладном месте. Через 12 часов содержимое колбы центрифугировали с частотой вращения 3000 об/мин в течение 30 минут. Полученную надосадочную жидкость фильтровали и сгущали на ротационном испарителе - ПФК.

Полученный ПФК представлял собой густую тягучую жидкость буро-коричневого цвета, кисло-горького вкуса со специфическим запахом. Содержание сухого остатка в ПФК составило 53,71%.

Пример 2. Изучение качественного и количественного состава БАВ ПФК плодов рябины обыкновенной

1. Изучение качественного состава БАВ ПФК плодов рябины обыкновенной

Для изучения качественного состава БАВ ПФК под вакуумом отгоняли спирт. Сгущенный ПФК разводили горячей водой очищенной, взбалтывали и отфильтровывали. Для разделения сложных смесей веществ полученного водного раствора применяли методы избирательной экстракции, используя в качестве экстрагентов гексан, хлороформ, этилацетат и н-бутанол. Таким образом нами было получено 4 фракции: гексановая (ГФ), хлороформенная (ХФ), этилацетатная (ЭАФ) и бутанольная (БФ).

Из полученных фракций под вакуумом на роторной установке отгоняли органические растворители. Остаток экстрактивных веществ растворяли в 95% спирте этиловом и анализировали с применением методов одномерной хроматографии на бумаге (БХ) и в тонком слое сорбента (ТСХ «Сорбфил») параллельно с известными веществами - свидетелями в различных системах растворителей (н-бутанол - уксусная кислота - вода 4:1:2, 4:1:5; 15-30% уксусная кислота). Обнаружение веществ проводили в фильтрованном УФ-свете при длине волны 254 нм до и после обработки хроматограмм 2% этанольным раствором хлорида алюминия [15, 16, 17]. Результаты определения представлены в таблице 4.

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

Таким образом, качественный состав ПФК рябины обыкновенной представлен флавоноидами (кверцетином и рутином), ФК (кофейной, п-кумаровой, хлорогеновой, феруловой и ванилиновой) и антоцианами (цианид-3-О-глюкозид).

2. Количественное определение основных групп БАВ ПФК плодов рябины обыкновенной

Нами было определено количественное содержание свободных сахаров, флавоноидов, ФК и антоцианов (табл.5).

Количественное содержание суммы свободных сахаров в пересчете на глюкозу определяли спектрофотометрическим методом [21].

Сумму флавоноидов в пересчете на рутин определяли спектрофотометрическим методом с использованием комплексообразующей реакции с алюминия хлоридом [9, 18].

Количественное содержание суммы ФК кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту определяли методом прямого спектрофотометрического анализа [19].

Содержание суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид определяли спектрофотометрическим методом по собственной окраске в видимой области [20].

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

В качестве препарата сравнения использовали Настойку эхинацеи пурпурной («ГаленоФарм», г. Санкт-Петербург, разрешена к применению на территории России, рег. №000167.01-2000), которую перед применением подвергали деалкоголизации (разводили необходимый объем настойки в 2 раза водой очищенной, упаривали в термостате при температуре 37°C до сокращения объема в 4 раза).

Влияние ПФК рябины обыкновенной на функциональную активность иммунокомпетентных клеток оценивали в экспериментах *in vivo* и *in vitro*. *In vivo* исследования были проведены на 60 мышах-самцах линии СВА/СaЛас массой 18-20 г, полученных из лаборатории ЭБМ ФГБУ «НИИ фармакологии имени Е.Д. Гольдберга» СО РАМН. Животные соответствовали 1 категории (согласно сертификату), содержались в неполной барьерной системе, имели постоянный доступ к воде и пище. Кормление мышей производилось полнорационным гранулированным кормом ПК 121-10 (ГОСТ-Р 50258-92). Поение животных осуществляли дистиллированной водой из стерилизованных пластиковых бутылочек с металлическими носиками-поилками. Образцы корма и воды периодически анализировались на микробиологическое загрязнение. Влияние ПФК изучаемого

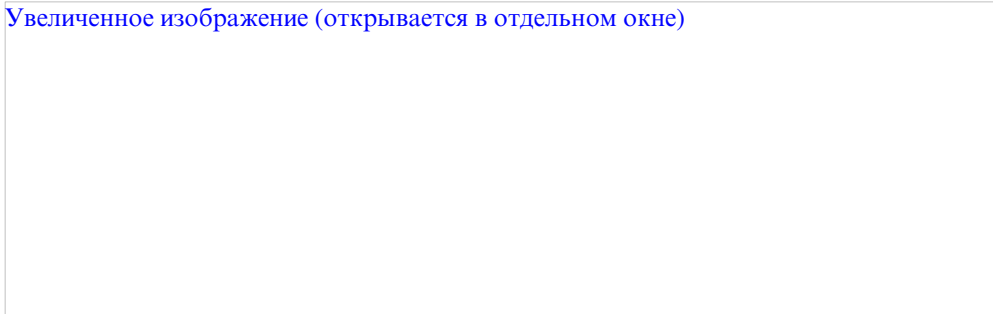
растения на функциональную активность иммунокомпетентных клеток *in vitro* определяли по способности мононуклеаров в спонтанном или митоген-стимулированном тесте синтезировать провоспалительные (IL-1, IL-2, IFN γ) и противовоспалительные (IL-4) цитокины в присутствии ПФК рябины обыкновенной. Полученные данные обрабатывали статистически с помощью программного обеспечения Statistica 6.0. Для всех выборок проверена гипотеза нормальности распределения по величине коэффициента асимметрии и коэффициента эксцесса. Для выборки, подчиняющейся нормальному закону распределения, вычисляли среднее значение величины признака X и ошибку средней величины m. Для выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения, вычисляли медиану Me и квартили Q₁-Q₃. Проверку гипотезы о равенстве средних проводили с использованием t-критерия Стьюдента, при несоответствии распределения нормальному закону использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Уровень значимости критериев задавали равным 0,1%, 1% либо 5%.

Пример 3. Влияние ПФК рябины на клеточное звено иммунитета *in vivo*

Животные были разделены на 3 группы: 10 мышей - контроль 1, получали в течение 5 дней по 0,2 мл дистиллированной воды внутривентриально; 10 - опыт 1, получали деалкоголизированную настойку эхинацеи пурпурной (НЭ), которую вводили животным в течение 5 дней в дозе 50 мг/кг в объеме 0,2 мл дистиллированной воды внутривентриально - прототип; 10 - опыт 2, получали ПФК рябины обыкновенной, которые вводили животным в течение 5 дней в дозе 50 мг/мл. Влияние ПФК рябины на клеточное звено иммунитета у животных линии СВА/СaLac оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Для этого мышей подвергали сенсибилизации путем подкожного введения 1×10^7 эритроцитов барана в объеме 100 мкл. На 5 день после сенсибилизации под апоневротическую пластинку одной из задних конечностей вводили разрешающую дозу антигена (1×10^8 в объеме 20 мкл). В контралатеральную лапу в качестве контроля вводили физиологический раствор в таком же объеме. Изучали влияние ПФК рябины на процесс образования клона антиген-специфических Т-лимфоцитов, для этого их вводили 5-дневным курсом мышам до сенсибилизации (I схема ГЗТ), а также влияние растительного соединения на продукцию провоспалительных цитокинов антигенспецифичными Т-лимфоцитами: ПФК рябины вводили 5-дневным курсом со дня сенсибилизации до введения разрешающей дозы (II схема ГЗТ) [22].

В результате проведенных экспериментов было выявлено, что курсовое введение ПФК, полученного из плодов рябины обыкновенной, способствовало снижению продукции лимфоцитами провоспалительных цитокинов при встрече с антигеном (табл.6).

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)



Влияние ПФК рябины на функциональную активность иммунокомпетентных клеток *in vitro* определяли по способности мононуклеаров в спонтанном или митоген-стимулированном тесте синтезировать провоспалительные (IL-1, IL-2, IFN γ) и противовоспалительные (IL-4) цитокины.

Мононуклеары выделяли с помощью центрифугирования из стабилизированной гепарином (25-30 ЕД/мл) периферической крови 18 практически здоровых доноров-добровольцев на градиенте плотности фиколл-пак ($\rho=1,077$, «Amersham Biosciences AB», Швеция). Жизнеспособность клеток подсчитывали в камере Горяева с трипановым синим и затем доводили объем до нужной концентрации - 2 млн/мл с помощью полной культуральной среды (ПРС), состоящей из среды RPMI-1640, 10% ЭТС, 2 мМ L-глутамина и 40 мкг/мл гентамицина.

Стимулированную продукцию цитокинов IL-1, IL-2, IL-4, IFN γ изучали в 24-часовых культурах клеток после добавления липополисахарида (ЛПС «Sigma», США) для наработки IL-1 или конканавалина А (Кон А, «Sigma», США) - IL-2, IL-4, IFN γ . Спонтанную выработку цитокинов определяли, культивируя мононуклеары в ПРС без стимуляторов. Для оценки синтеза основных иммуноглобулинов культуры клеток, активированные митогеном лаконоса (МЛ, «Sigma», США), инкубировали в течение 10 дней. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂. В опытные пробы добавляли исследуемые ПФКР в 2-х концентрациях 50 и 500 мкг/мл непосредственно перед культивированием

моноклеаров. Препарат сравнения (настойку эхинацеи) подвергали деаглолизации и вводили в питательные среды в дозе 50 мкг/мл. Контрольными пробами считали клетки, инкубированные без ПФК рябины.

Концентрацию изучаемых цитокинов в супернатантах моноклеарных клеток определяли иммуноферментным методом, используя соответствующие наборы («Вектор-Бест», Новосибирск).

Пример 4. Влияние ПФК рябины на продукцию IL-1 in vitro

В опытах in vitro ПФК рябины обыкновенной в выбранных концентрациях (50 и 500 мкг/мл) без митогенной стимуляции не оказывал влияния на синтез IL-1.

Инкубация митогенстимулированных клеток с ПФК рябины обыкновенной в дозе 50 мкг/мл приводила к снижению синтеза цитокина (374,73 (371,18-376,57) пг/мл) по сравнению с контролем (393,15 (392,30-394,43) пг/мл; $p < 0,05$) и настойкой эхинацеи (381,24 (372,59-384,93) пг/мл; $p < 0,05$).

Пример 5. Влияние ПФК рябины на продукцию IL-2 in vitro

В спонтанном тесте ПФК рябины не оказывал влияние на синтез IL-2. Добавление к митогенстимулированным культурам клеток ПФК рябины обыкновенной в дозе 50 и 500 мкг/мл приводило к снижению выработки исследуемого цитокина по сравнению с контролем и препаратом сравнения ($p < 0,05$) (табл.7).

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)



Пример 6. Влияние ПФК рябины на продукцию IFN γ in vitro

В опытах in vitro ПФК рябины обыкновенной способствовал снижению концентрации IFN γ в культурах моноклеаров в стимулированном тесте. Уровень митогенстимулированного синтеза IFN γ после внесения ПФК рябины в дозе 500 мкг/мл снижался относительно контроля и препарата сравнения и не отличался от показателей в спонтанном тесте. ПФК рябины в дозе 50 мкг/мл не влиял на стимулированный синтез данного цитокина (табл.8).

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)



Пример 7. Влияние ПФК рябины на продукцию IL-4 in vitro

ПФК рябины не влиял на спонтанную и стимулированную продукцию противовоспалительного цитокина - IL-4 в опытах in vitro. Настойка эхинацеи способствовала снижению синтез IL-4 в стимулированном тесте (табл.9).

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)

Таким образом экспериментально установлено, что ПФК, выделенный из водно-спиртового экстракта плодов рябины обыкновенной путем очистки от белково-полисахаридного комплекса 95% этиловым спиртом, примененный 5-дневным курсом в дозе 50 мг/кг внутрижелудочно, снижает продукцию провоспалительных цитокинов антиген-активированными Т-лимфоцитами в отличие от прототипа - настойки эхинацеи. В опытах *in vitro* ПФК рябины обыкновенной не влиял на продукцию противовоспалительного цитокина IL-4 митоген-активированными клетками и в большей степени, чем препарат сравнения (настойка эхинацеи), способствовал снижению митоген-индуцированного синтеза провоспалительных цитокинов IL-1, IL-2 в концентрации 50 мкг/мл и IL-2, IFN γ в дозе 500 мкг/мл.

ПФК, выделенный из водно-спиртового экстракта плодов рябины обыкновенной путем очистки от белково-полисахаридного комплекса 95% этиловым спиртом, обладает противовоспалительной активностью и может расширить арсенал лекарственных средств, применяемых при воспалительных заболеваниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. Иммунология воспаления: роль цитокинов // Медицинская иммунология. - 2001. - №3. - С.361-368.
2. Дроговоз С.М., Зупанец М.В., Кононенко А.В. Перспективы создания противовоспалительных средств на основе d-(+)-глюкозиламониевых солей 3-оксамоилзамещенных п-фенилантраниловых кислот и экстракта листьев рябины обыкновенной // Научно-производственный журнал разработка и регистрация лекарственных средств. - 2013. - №3. - С.64-68.
3. Куцык Р.В., Зузук, Б.М., Рыбак, О.В.. Иммунокорректирующие и противовоспалительные свойства биологически активных веществ растений рода *Echinacea Moench* // Провизор. - 1999. - №4 - С.157-204.
4. Sharma, M. Schoop, R. & Hudson, JB *Echinacea* as an antiinflammatory agent: the influence of physiologically relevant parameters // *Phytother. Res.* - 2008 V.23: - P.863-867.
5. Speroni E, Govoni P, Guizzardi S, Renzulli C, Guerra MC. Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *Echinacea pallida* Nutt. root extract // *J. Ethnopharmacol.* - 2002 - V.79 - P.265-272.
6. Носовская Т.Д. Лечебные свойства рябины обыкновенной // Провизор. - 2000. - №6 - С.37-39.
7. Aggarwal, B.V. Shishir Shishodia Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer, // *biochemical pharmacology.* - 2006. - 3.1397-1421.
8. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т.2. Семейства Actinidiaceae - Malvaceae, Euphorbiaceae - Halogagaceae. - СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2009. - С.243-245.
9. Химическое изучение биологически активных полифенолов некоторых сортов рябины обыкновенной - *Sorbus Aucuparia* / Д.И. Писарев, О.О. Новиков, В.Н. Сорокопудов и др. // Научные ведомости. - №22 (93). - С.123-128.
10. Edeas M.A., Lindenbaum A. Protective effects in various flavonoid compounds on HIV infections // *Bulletin O.I.V.* - 2000. - №73. - P.810-818.
11. Johnson J.J., Bailey H.H., Mukhtar H. Green tea polyphenols for prostate cancer chemoprevention: a translational perspective // *Phytomedicine.* - 2010. - V.17. - №1 - P.3-13.
12. Биохимия: Учебник / Под ред. Е.С. Северина. - 3-е изд., испр. - М.: Гэотар-Медиа, 2005. - 784 с.
13. Масная Н.В., Исайкина Н.В., Шерстобоев Е.Ю., Калинкина Г.И. Влияние полифенольных соединений, выделенных из *Carthamus tinctorius* и *Calendula officinalis* L., на функциональную активность иммунокомпетентных клеток в условиях цитостатической иммуносупрессии // Бюллетень сибирской медицины. - 2013. - №3 (12). - С.41-51.
14. Промышленная технология лекарств: Учебник. В 2-х т. Том 2 / В.И. Чуешов,

М.Ю. Чернов, Л.М. Хохлова и др. Под ред. проф. В.И. Чуешова. Х.: НФАУ, 2002. - С.99

15. Бандюкова, В.А. Тонкослойная хроматография флавоноидов // Химия природных соединений. - 1973. - №1. - С.20.

16. Бандюкова, В.А. Фенолокислоты растений, их эфиры и гликозиды // Химия природных соединений. - 1993. - №. - С.263-273.

17. Бандюкова, В.А. Шинкоренко А.Л. Качественный анализ флавоноидов в растительном материале при помощи хроматографии на бумаге: методические рекомендации. Пятигорск: 1972. - 23 с.

18. Государственная фармакопея СССР. Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. - 11-е изд., доп. М., 1989. - С.323-325.

19. Коломиец, Н.Э. Калинкина Г.И., Сапронова Н.Н. Стандартизация листьев крапивы двудомной // Фармация. - 2011. - №6. - С.22-24.

20. Методика определения антоцианов в плодах аронии черноплодной / В.Ю. Андреева, Г.И. Калинкина, Н.Э. Коломиец и др. // Фармация. - 2013. - №3. - С.19-21.

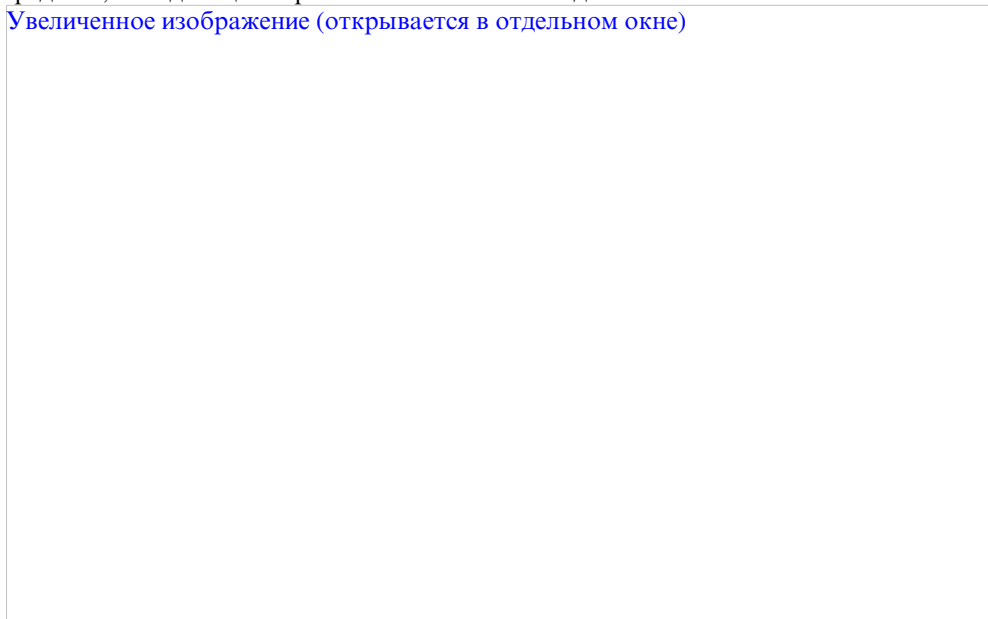
21. Самылина И.А., Рудакова И.П., Аладышева Ж.И., Ковалева С.В. Определение сахаров спектрофотометрическими методами // Фармация. - 2009. - №4. - С.3-5.

22. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. М., 2005. - 832 с.

Формула изобретения

Применение полифенольного комплекса, полученного путем экстракции измельченных плодов рябины обыкновенной 40% спиртом этиловым при соотношении 1:5 с последующим сгущением полученного водно-спиртового экстракта до ½ объема добавлением 95% спирта этилового в соотношении 1:3, центрифугированием осадка через 12 часов, фильтрованием и сгущением надосадочной жидкости с получением полифенольного комплекса, в качестве средства, обладающего противовоспалительным действием.

[Увеличенное изображение \(открывается в отдельном окне\)](#)



ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: 27.03.2016

Дата публикации: [27.11.2016](#)