

УДК 615.014; 615.454.1; 615.838

А. О. КОБЕРНІК¹, аспірант,

І. А. КРАВЧЕНКО^{1,2}, д.б.н., професор,

О. І. АЛЕКСАНДРОВА¹, к.б.н., доцент

¹Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра фармацевтичної хімії

вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: koberni@mail.ru

²Фізико-хімічний інститут імені О. В. Богатського НАН України, Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

БІОФАРМАЦЕВТИЧНІ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІКАРСЬКИХ СЕРВЕТОК З СІЛЛЮ КУЯЛЬНИЦЬКОГО ЛИМАНУ

На моделі каррагінан-індукованого набряку встановлено, що ропа Куяльницького лиману володіє протизапальною активністю. Встановлено, що розроблена лікарська форма може використовуватися як альтернативний засіб в терапії запальних процесів.

Ключові слова: протизапальна дія, ропа, Куяльницький лиман, каррагінановий набряк.

Запалення є захисною реакцією, яка направлена на елімінацію патогенного чинника із організму, в ряді випадків вона може призвести до пошкодження тканин і стати причиною стійкого зниження або втрати їх функції. Для пригнічення надмірної запальної реакції використовуються нестероїдні та стероїдні протизапальні препарати. Незважаючи на широке їх різноманіття, актуальним залишається пошук альтернативної терапії, так як всі вони не позбавленні шкідливих для організму побічних ефектів [9].

Разом з тим, все частіше увагу вчених привертають протизапальні агенти природного походження, не останнє місце в їх переліку займає і бальнеотерапія.

Під впливом насиченого розчину солі (ропи) виникають деформації термочутливих структур шкіри, в них покращується кровообіг і постачання рідини в капілярне русло, активуються фактори антикоагулянтної системи крові і зменшуються тромбоутворюючі реакції. Зменшення кількості антитіл в крові призводить до активації процесів імунітету. Вказані процеси, разом зі стимуляцією регенерації, сприяють швидкому пригніченню осередку запалення. До непрямой реакції організму відноситься покращення процесів окиснення в життєвоважливих органах, крім того, зменшується набряк тканин [1, 6].

Метою роботи було створення лікарських серветок на основі сухої ропи Куяльницького лиману та вивчення їх протизапальної активності.

Матеріали та методи дослідження.

Для отримання сухого концентрату ропи Куяльницького лиману нативна її форма піддавалася висушуванню в спеціальних чашках в сушильній шафі при $t = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ до постійної ваги.

Визначення вмісту аніонів, катіонів та домішок, що відновлюються, в аналізованих зразках проводили стандартними аналітичними методами титрування [12].

Таблиця 1

Склад лікувальних серветок з сіллю Куяльницького лиману

№ зразка серветки	Полівініловий спирт (ПВС), г	Сіль Куяльницького лиману, г	Вода дистильована, мл
1	10	10	до 100
2	10	15	до 100
3	10	20	до 100

Активність каталази у зразках визначали за методом Р. С. Кацнельсона, а пероксидази за методом К. А. Козлова [11]. В якості порівняння використовували екстракт пелоїду «Пеладекс».

Приготування серветок проводили наступним чином: до наважки полівінілового спирту (ПВС) додавали дистильовану воду, змішували, підігрівали, до однорідної консистенції. Потім розчин охолоджували під струменем холодної води, додавали відповідну кількість солі Куяльницького лиману, ретельно перемішуючи. Отримавши однорідну суміш, наносили її на марлю, певного розміру (40x50 см). Марлю попередньо зважували. Отриманні серветки залишали висихати до постійної ваги при кімнатній температурі. В таблиці 1 представлені співвідношення компонентів серветок, що містять концентрат ропи Куяльницького лиману.

Також аналогічним чином були виготовлені контрольні серветки для визначення специфічної дії Куяльницької ропи, що містили 10 г ПВС та 15 г хлориду натрію, об'єм розчину доводили дистильованою водою до 100 мл.

Для визначення вмісту солей зразки серветок площею 25 см² витримували в 5 мл дистильованої води (за необхідності можна підігріти при температурі не більше 50 °С), кількісно перенесли отриманий розчин в колбу об'ємом 25 мл і доводили дистильованою водою до мітки. Далі отриманий розчин центрифугували протягом 5 хвилин при 7000 об/хв, відбирали центрифугат і визначали кількість аніонів та катіонів за допомогою аналітичних методів титрування. Виходячи з отриманих результатів розраховували їх вміст (мг екв) в пов'язках розміром 40x50 см.

Дослідження протизапальної та протинабрякової активності отриманих лікарських форм проводили на моделі каррагінанового набряку задньої кінцівки щурів (вводили по 0,2 мл 0,2% розчину каррагінану в задню праву кінцівку) [13]. Експериментальні дослідження проводились відповідно до методичних рекомендацій Державного фармакологічного центру МОЗ України [14] та комісії з біоетики ОНУ імені І. І. Мечникова МОНМС України (протокол №2 від 14 квітня 2009 р.). Протягом дослідження вимірювали об'єм (в см³) набряку. Лікування відбувалося щодня протягом 20 хвилин: на уражену кінцівку накладали лікарські пов'язки розміром 3x10 см (декілька шарів) та фіксували гумовою плівкою.

Результати та їх обговорення

Багато іонів, що входять до складу сухої ропи, мають біологічно-активну дію, тому були відібрані основні іони в реалізації протизапального і спазмолітичного ефекту лиманної ропи.

Так, магній володіє спазмолітичною дією, розслабляючи гладку мускулатуру, знижує збудливість центральної нервової системи та є антагоністом кальцію. В свою чергу, кальцій забезпечує звуження судин та збільшення судинного опору, а також в невеликих дозах є десенсибілізатором (гіпоалергенний ефект). Хлорид-іони сприяють розвитку гіперполяризації нервових клітин, зменшенню їх збудливості та провідності [7]. Вибір аналізованих іонів також був обумовлений їх високим вмістом в зразках.

На підставі проведених раніше досліджень було доведено, що сіль, отримана шляхом висушування нативної ропи при 60 °С, повністю відповідає нативній. Крім того, методом

атомно-емісійної спектрометрії було встановлено, що в солі Куяльницького лиману концентрація всіх іонів важких металів знаходиться в межах допустимого діапазону [3].

Наступним етапом роботи було порівняння ферментативної активності нативної та сухої ропи. На основі раніше проведених досліджень, показано, що пелоїд Куяльницького лиману володіє вираженою ферментативною активністю, зокрема була встановлена активність каталази, пероксидази та протеази [4, 5]. Ропа є середовищем пелоїду, а отже окрім багатокомпонентного мінерального складу, в її розчині присутні і кремнієва кислота, гумінові кислоти, вітаміни, гормони, ферменти, біогенні стимулятори, амінокислоти, жирні кислоти, полісахариди [10].

В межах даного дослідження була встановлена ферментативна активність окисно-відновних ферментів (каталази та пероксидази), яка знаходиться в кореляційній залежності з основними фізико-хімічними властивостями та протизапальною активністю ропи [11].

Функцією каталази та пероксидази є забезпечення реакції розпаду перекису водню, що утворюється в процесі дихання живих організмів і в результаті різноманітних біохімічних реакцій окиснення органічних сполук, на воду та молекулярний кисень [11].

Визначення активності каталази проводили за різних температурних умов інкубації: 37 °С, 42 °С протягом 60 хвилин. Виходячи із отриманих результатів, видно, що температура інкубації розчину суттєво не впливає на каталазну активність зразків (табл. 2). Встановлено, що під час висушування нативної ропи при температурі 60 °С в отриманому концентраті солі зберігається каталазна активність (табл. 2). Про це свідчить той факт, що відновлена ропа за рівнем каталазної активності достовірно не поступається нативній. Активність пелодексу, який ми брали в якості зразка для порівняння, наразі є дещо нижчою.

В результаті дослідження обраних зразків, встановлено, що всі вони володіють пероксидазною активністю на приблизно однаковому рівні.

В даному випадку важливим є те, що відновлена ропа не поступається за показниками пероксидазної активності нативним зразкам, що свідчить про можливість отримання сухого концентрату нативної ропи Куяльницького лиману в умовах її висушування при 60.

Таким чином, на підставі отриманих результатів, нами доведено, що сіль, отримана висушуванням при 60 за показниками ферментативної активності та фізико-хімічними властивостями відповідає нативній ропі.

Сольові розчини протягом тривалого часу застосовуються як протизапальні агенти [2]. Однак, застосування їх у вигляді компресів і обгортвань є незручним, оскільки відсутня можливість контролю площі поверхні контакту з ділянками дії. Крім того, концентрація нативної ропи значно варіює, особливо в різні пори року. Оптимізація лікування вимагає створення стандартизованих лікарських форм [8], в першу чергу це стосується концентрації солей.

Одним з вирішень цієї проблеми є створення гідрофільних пов'язок, здатних утримувати сполуки і вивільняти їх протягом певного часу.

Необхідним елементом матриць є пластифікатор, який додає їм гнучкість і утримує

Таблиця 2

Ферментативна активність ропи, Е/мл розчину

Досліджуваний зразок	Активність каталази,		Активність пероксидази (37 °С)
	при 42 °С	при 37 °С	
Пелодекс	9,84 ± 0,04	10,2 ± 0,02	11,00 ± 0,75
Ропа нативна	12,36 ± 0,03	12,72 ± 0,03	10,83 ± 0,69
Ропа відновлена із солі, отриманої висушуванням при 60 °С	12,84 ± 0,04	12,24 ± 0,03	9,50 ± 0,65

необхідну кількість води. Створення необхідного терапевтичного ефекту визначатиметься фізико-хімічними властивостями лікарських пов'язок, які залежать від кількості в гідрофільній матриці пластифікатора та концентрату ропи Куяльницького лиману.

Тому, наступним етапом роботи була розробка оптимального складу лікарських серветок, які містили б максимальну кількість солі, але при цьому не втрачали б пластичності, гнучкості та однорідності. Було створено 3 зразки, склад яких наведено у таблиці 1.

Необхідно відмітити, що під час приготування зразка № 3, утворювались нерозчинні згустки, розчин втрачав свою однорідність. Напевно, значна кількість солі втрачалась при утворенні комплексу з ПВС. Тому необхідною умовою було встановлення вмісту катіонів та аніонів в серветках з різною концентрацією солі Куяльницького лиману.

Як видно з отриманих результатів (табл. 3), збільшення в складі пов'язок концентрації солі від 10 г до 15 г призводило до логічного та чисельно відповідного збільшення вмісту вказаних катіонів та аніонів в пов'язках.

Однак, збільшення кількості внесеної солі до 20 г не покращувало показники вивільнення катіонів та аніонів з серветок (зразок № 3), це може бути обумовлено тим, що під час їх виготовлення утворювався нерозчинний комплекс солі та ПВС, тому певна кількість солей при цьому втрачалась.

За результатами аналітичних методів дослідження серветок на основі солі Куяльницького лиману, встановлено, що оптимальним за концентрацією солі є зразок № 2, який містив у своєму складі 15 г солі. Саме для нього характерний найбільший вміст катіонів і аніонів.

Тому, на підставі отриманих результатів, оптимальним для визначення протизапальної активності обрано зразок № 2.

Протизапальну активність лікарських серветок вивчали на моделі каррагінан-індукованого запалення задньої кінцівки щурів. В якості контролю використовували показники групи дослідних щурів, яка не піддавалася лікуванню.

З метою доведення ключової ролі унікального багатоконпонентного мінерального складу концентрату ропи Куяльницького лиману в обумовленні протинабрякового ефекту було виготовлено також серветки, до складу яких замість солі Куяльницького лиману було внесено хлорид натрію.

На рис.1 представлено результати зміни об'єму уражених кінцівок щурів різних експериментальних груп. На підставі отриманих результатів, встановлено, що показники об'єму уражених кінцівок всіх дослідних груп щурів через 24 години після введення флогогенного агента в 1,5–2 рази перевищували інтактні показники. Через 48 годин після введення каррагінану показники об'єму задніх кінцівок в групах щурів, які піддавалися лікуванню сольовими компресами та серветками, розробленими на основі концентрату ропи Куяльницького лиману, поступово почали зменшуватися. В той час як об'єм уражених кінцівок щурів в контрольній групі та групі, яку лікували накладанням серветок на основі хлориду натрію

Таблиця 3

Вміст катіонів та аніонів в лікарських серветках (мг екв)

№ зразка	концентрат ропи, г	Cl ⁻ /PO ₄ ³⁻	Ca ²⁺ +Mg ²⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
1	10	153,37 ± 1,62	160,91 ± 1,92	1,66 ± 0,01	158,40 ± 3,91
2	15	228,09 ± 2,21	267,29 ± 2,43	2,28 ± 0,02	267,29 ± 2,23
3	20	139,50 ± 1,94	147,71 ± 2,12	1,26 ± 0,01	147,71 ± 2,22

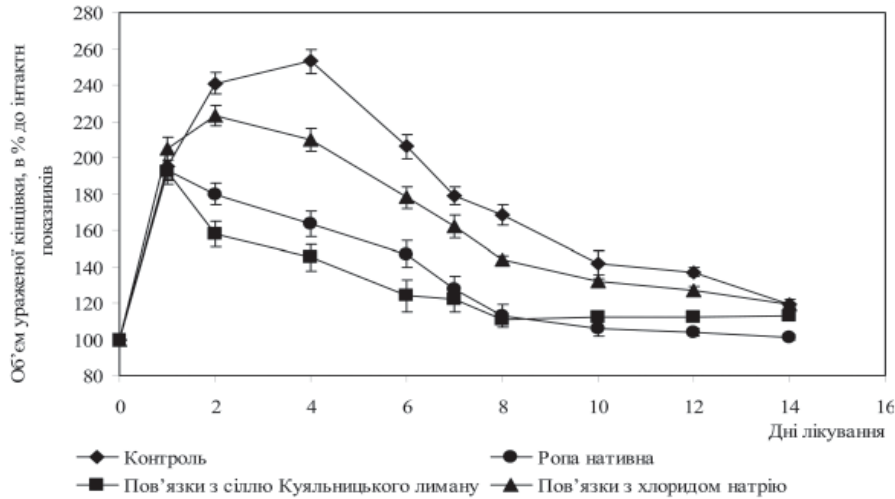


Рис. 1. Вплив нативної ропи та серветок з сіллю на об'єм уражених кінцівок щурів при каррагінановому запаленні (см³)

продовжував збільшуватися, сягнувши свого піку на 4 та 2 дні експерименту, відповідно. Але після 4 доби, показники ураженої кінцівки контрольної групи та групи експериментальних тварин, яких лікували за допомогою пов'язок на основі хлориду натрію теж почали зменшуватись, поступово повертаючись до початкових показників об'єму.

Слід зазначити, що протягом всього періоду дослідження розроблені нами серветки на основі концентрату ропи Куяльницького лиману за показниками протизапальної дії не поступалися компресам з нативної ропи.

При використанні серветок з концентратом ропи вже на 2 добу об'єм набряку на 60–70% був меншим, порівняно з контрольною групою тварин. На 4 та 6 добу дана перевага складала приблизно 80 та 70%, відповідно.

Показано, що вже на 8–10 добу дослідження показники об'єму майже досягли інтактних показників для груп, які піддавалися лікуванню сольовими компресами та розробленими серветками на основі концентрату ропи Куяльницького лиману. Показники контрольної групи тварин приблизно на 55% перевищували початковий об'єм.

Керуючись отриманими результатами, можна стверджувати, що протинабряковий ефект солі та ропи Куяльницького лиману обумовлений її багатокомпонентним складом, адже серветки на основі хлориду натрію лише незначним чином покращували динаміку процесу запалення.

Наразі, встановлено, що у складі серветок, сіль Куяльницького лиману не втрачає своєї протинабрякової активності.

Висновки

1. Було запропоновано склад серветок на основі концентрату ропи Куяльницького лиману, отриманого шляхом висушування нативної ропи при 60 С.
2. Стандартними методами титрування встановлено, що оптимальне співвідношення компонентів притаманне серветкам, які містять у своєму складі 15 г солі.
3. Доведено, що за рівнем протинабрякової активності розроблені серветки на основі

солі Куяльницького лиману в якості самостійного лікувального чинника не поступається ефекту нативної ропи.

4. Показано, що протинабряковий ефект нативної ропи та солі Куяльницького лиману, обумовлений їх багатокомпонентним мінеральним складом, адже при використанні серветок, що містили хлорид натрію спостерігалось лише незначне зменшення об'єму уражених кінцівок щурів.

Список літератури

1. Вайсфельд Д. Н. Лечебное применение грязей / Д. Н. Вайсфельд, Т. Д. Голуб. – К.: Здоров'я. – 1980. – 142 с.
2. Золотарева Т. А. О роли химического фактора в биологическом действии лечебной грязи / Т. А. Золотарева // Вопр. курортол. – 1988. – № 2. – С. 50–52.
3. Коберник А. А. Биофармацевтическое и фармакологическое изучение образцов рапы Куяльницкого лимана / А. А. Коберник, И. А. Кравченко, В. Б. Ларионов, Н. В. Овчаренко, А. И. Александрова, Е. Г. Пыхтеева, Д. В. Большой // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки і практики. – 2011. – V. 24 (2). – С. 70–73.
4. Коберник А. А. Активность каталазы и протеазы в пелоидах Куяльницкого лимана и Сакского озера / А. А. Коберник, И. А. Кравченко, А. И. Сивко, Ю. Н. Шкрятко // Сучасні тенденції розвитку медицини, ветеринарії та фармакології: V міжнар. науково-практ. конф., 22-23 червня 2011 р.: матеріали. – Одеса, 2011. – С. 100–101.
5. Коберник А. О. Визначення ферментативної активності природних пелоїдів / А. О. Коберник, І. А. Кравченко, Г. І. Сівко, Ю. М. Шкрятко // Вісник морської медицини. – 2011. – № 3. – С. 164–166.
6. Лещинский А. Ф. Лечение воспалительных заболеваний (пелоидотерапия, противовоспалительные препараты и их сочетания) / А. Ф. Лещинский, З. И. Зуза. – К.: Здоров'я. – 1976. – 112 с.
7. Лещинский А. Ф. Пелоидо- и фармакотерапия при воспалительных заболеваниях / А. Ф. Лещинский, З. И. Зуза. – К.: Здоров'я. – 1985. – 184 с.
8. Самутин Н. М. Актуальные проблемы пелоидотерапии / Н. М. Самутин, Н. Г. Кривобоков // Вопр. курортол. – 1997. – № 3. – С. 33–35.
9. Серов В. В. Воспаление. Руководство для врачей / В. В. Серов, В. С. Пауков. – М.: Медицина. – 1995. – 328 с.
10. Требухов Я. А. Лечебные грязи и минеральные водоемы / Я. А. Требухов // Курортология и физиотерапия (руководство) / Под ред. В. М. Боголюбова. – Т. 1. – М.: Медицина. – 1985. – С. 128–138.
11. Хазиев Ф. Х. Ферментативная активность почв / Ф. Х. Хазиев. – М.: Наука. – 1976. – 173 с.
12. Цитович И. К. Курс аналитической химии / И. К. Цитович. – М.: Наука. – 1994. – 496 с.
13. Morris C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse / C. J. Morris // Methods Mol. Biol. – 2003. – V. 225. – P. 115–121.

А. А. Коберник¹, И. А. Кравченко^{1,2}, А. И. Александрова¹

¹Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, кафедра фармацевтической химии,

ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина. e-mail: koberni@mail.ru

²Физико-химический институт имени А. В. Богатского НАН Украины, Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина

БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ САЛФЕТОК С СОЛЬЮ КУЯЛЬНИЦКОГО ЛИМАНА

Резюме

На модели каррагинанового отека установлено, что рапа Куяльницкого лимана обладает противовоспалительной активностью. Установлено, что разработанная лекарственная форма может использоваться как альтернативное средство при терапии воспалительных процессов.

Ключевые слова: противовоспалительное действие, рапа, Куяльницкий лиман, каррагинановый отек.

A. A. Kobernik¹, I. A. Kravchenko^{1,2}, O. I. Alexandrova¹

¹Odesa National Mechnykov University, Pharmaceutical Chemistry Department,
2, Dvoryanska Srt., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: koberni@mail.ru,

²A.V. Bogatsky Physico-chemical institute of the NASU,
86, Lustdorfska doroga, Odesa, 65080, Ukraine.

BIOPHARMACEUTICAL AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF THE KUYALNIC ESTUARY SALINE MEDICAL FORMS

Summary

It was showed that saline concentrated from the Kuyalnic estuary had anti-inflammatory and anti-edema activity. It was proved by the authors that the developed medicinal form could be used as the alternative agent in the therapy of inflammatory processes.

Key words: anti-inflammatory activity, the Kuyalnic estuary saline, model of carrageenan edema.