

УДК 615.35
DOI: 10.21668/health.risk/2023.3.16



Научная статья

ЭКСТРАКТ СТРОБИЛОВ ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ МИНИМИЗАЦИИ РИСКОВ РАЗВИТИЯ ВОСПАЛЕНИЯ

**Д.К. Гуляев, Д.Ю. Апушкин, А.И. Андреев, А.С. Сульдин,
П.С. Машенко, Т.А. Утушкина, К.Е. Якушина**

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 614068, г. Пермь,
ул. Букирева, 15

Исследована противовоспалительная активность сухого водного экстракта стробилов ели обыкновенной при разных путях введения.

Стробилы ели обыкновенной для получения экстракта были заготовлены на территории Пермского края Российской Федерации в смешанном лесу с преобладанием ели обыкновенной и сосны обыкновенной. Сухой водный экстракт получали по оригинальной запатентованной методике. Определение содержания процианидинов в стробилах ели обыкновенной и сухих экстрактах проводили с помощью кислотного расщепления процианидинов до антоцианидинов по методу Портера. Определение противовоспалительной активности проводили на модели каррагининового отека лапы крысы. В эксперименте использовались белые лабораторные аутбредные крысы стока линии Wistar.

По результатам исследования установлено, что содержание процианидинов в образцах стробилов ели обыкновенной составляет около 13 %. Установлено, что при внутрибрюшинном введении в дозировке 100 мг/кг экстракт стробилов ели обыкновенной обладает выраженной противовоспалительной активностью. При внутрибрюшинном введении меньших доз удалось установить, что экстракт ели обыкновенной стробилов обладает выраженной противовоспалительной активностью в дозировке 50 мг/кг. Доза 10 мг/кг, согласно данным гидрометрии, успешно подавляет воспаление (50 % подавления отека) на первом и третьем часе после введения каррагинина ($p < 0,05$), однако данные фотометрии это не подтверждают. При пероральном введении экстракта противовоспалительная активность не выявлена. При ректальном пути введения также не установлено выраженной противовоспалительной активности у исследуемого экстракта.

Экстракт ели обыкновенной стробилов, полученный по оригинальной методике, содержит 56 % процианидинов и проявляет выраженную противовоспалительную активность при внутрибрюшинном введении. Применение экстракта при пероральном и ректальном путях введения требует более глубокого изучения.

Ключевые слова: ель обыкновенная, стробилы, сухой экстракт, процианидины, внутрибрюшинное введение, пероральное введение, ректальное введение, противовоспалительная активность.

На территории Российской Федерации для проведения лесовосстановительных работ производится заготовка стробилов хвойных пород с целью получения семян. Воспроизводство лесов включает в себя лесное семеноводство и лесовосстановление. Выход семян из

пишек составляет всего около 2 %. После извлечения семян стробилы остаются в лесничествах в огромных количествах. Богатый химический состав ели обыкновенной стробилов является основой для поиска перспективных фармакологически активных веществ.

© Гуляев Д.К., Апушкин Д.Ю., Андреев А.И., Сульдин А.С., Машенко П.С., Утушкина Т.А., Якушина К.Е., 2023
Гуляев Дмитрий Константинович – кандидат фармацевтических наук, заведующий учебно-производственной лабораторией химического факультета (e-mail: dkg2014@mail.ru; тел.: 8 (902) 807-10-04; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9464-1869>).

Апушкин Данила Юрьевич – старший преподаватель кафедры фармакологии и фармации (e-mail: apushkinjob@gmail.com; тел.: 8 (342) 239-64-01; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4459-5264>).

Андреев Александр Игоревич – старший преподаватель кафедры фармакологии и фармации (e-mail: mniium@yandex.ru; тел.: 8 (342) 239-64-01; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3718-4830>).

Сульдин Александр Сергеевич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии и фармации (e-mail: suldin@mail.ru; тел.: 8 (342) 239-64-01; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4366-7772>).

Машенко Петр Сергеевич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии и фармации (e-mail: petlya11@mail.ru; тел.: 8 (342) 239-64-01; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2259-7659>).

Утушкина Таисия Андреевна – студент (e-mail: tais.utu@mail.ru; тел.: 8 (342) 239-64-01; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6314-1850>).

Якушина Каролина Евгеньевна – студент (e-mail: yakushinake@psu.ru; тел.: 8 (912) 491-32-77; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3050-0220>).

Нами разработан способ получения сухого водного экстракта ели обыкновенной стробилов, где одной из ведущих групп биологически активных веществ являются конденсированные дубильные вещества, или процианидины.

Изучение проантоцианидинов началось Жаком Маскелье в 1940-х гг. с исследования сосновой коры, которую коренные американцы варили для лечения цинги [1]. Процианидины представляют собой производные флаван-3-олов, которые имеют типичный С6–С3–С6-флавоноидный скелет. Всего обнаружено около 15 подклассов проантоцианидинов, из которых наиболее распространенными являются процианидины. Различают димерные, тримерные, тетрамерные и полимерные процианидины [2].

Процианидины представляют интерес для медицины, поскольку обладают множеством полезных свойств [3, 4]. Процианидин D1 показал свою эффективность при ревматоидном артрите при пероральном введении в течение 23 дней. Противовоспалительный эффект был опосредован регуляцией баланса клеток Th17 (Т-хелперы, продуцирующие интерлейкин 17) / Treg (Т-супрессоры), регуляторный эффект, в свою очередь, был связан с ингибирующим действием процианидина D1 на экспрессию AHR (рецептор ароматических углеводородов) [5]. Процианидин B1 увеличивает приток мезенхимальных стволовых клеток к ранам и ускоряет их заживление на модели мыши с диабетом [6]. Процианидин C1 проявляет противоопухолевые свойства путем индукции апоптоза клеток рака молочной железы [7].

В источниках литературы описано разное влияние процианидинов на иммунную систему. На модели пролиферации спленоцитов показано, что процианидин D1 проявляет иммуносупрессорное действие, дозозависимо снижает уровни интерферона α (IFN- α) и интерлейкина-2 (IL-2) [8].

Водный экстракт коры черной ели содержит значительное количество процианидинов и проявляет антирадикальную и противовоспалительную активность [9]. Процианидины А типа, выделенные из коры корицы, – *Cinnamomum verum* J. Presl семейства Лавровые (*Lauraceae*), проявляют противовоспалительную активность на моделях каррагининового отека и адьювантного артрита у крыс [10].

По данным ВОЗ, хронические воспалительные заболевания – одна из самых серьезных причин смерти в мире. Ожидается, что их распространенность в мире будет неуклонно расти в течение последующих лет. К воспалительным заболеваниям относятся: инсульт, хронические респираторные заболевания, сердечные заболевания, рак, ожирение, диабет и др.¹ [11].

Учитывая высокую фармакологическую активность процианидинов, выделенных из растительных источников, представляет интерес определить противовоспалительную активность экстракта стробилов ели.

Цель исследования – определить содержание процианидинов экстракта ели обыкновенной стробилов и оценить при разных путях введения его противовоспалительную активность.

Материалы и методы. Объектом исследования являются стробиловы ели обыкновенной (*Picea abies* (L.) Karst., *Pinaceae*), произрастающей на территории Пермского края, РФ. Ели обыкновенной стробиловы для получения экстракта заготавливали на территории Ильинского района Пермского края в смешанном лесу с преобладанием ели обыкновенной и сосны обыкновенной. После заготовки шишки высушивали воздушно-теневым способом.

Способ получения экстракта. Около 50 г стробилов ели, измельченных до частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в колбу, прибавляют 1,5 л воды (гидромодуль 1:30) и экстрагируют при перемешивании в течение 1,5 ч при нагревании 80–85 °С. По окончании экстракции сырье отделяют от экстракта фильтрованием. Полученный экстракт сгущают под вакуумом при температуре 80–85 °С в 10 раз от первоначального объема. Далее происходит отделение балластной, неактивной фракции путем охлаждения упаренного экстракта при температуре -18 °С в течение 15 мин. При этом выпадает осадок, в который попадают: часть полисахаридного комплекса, белки, дубильные вещества, смолистые вещества. Осадок уплотняют центрифугированием и отбрасывают. Далее надосадочную жидкость выпаривают в вакуум-выпарном аппарате до густой массы и высушивают в сушильном шкафу при температуре 50 °С².

Экстракт представляет собой аморфный порошок светло-коричневого цвета со специфическим запахом. Растворим в воде, частично растворим в 50%- и 70%-ном спирте этиловом, не растворим в диэтиловом эфире, этилацетате, хлороформе.

Получение микрокапсул в оболочке из АФЦ. Микрокапсулы в оболочке из ацетилфталилцеллюлозы (АФЦ) получают путем испарения легколетучего растворителя в жидкой среде. Изначально 2 г порошка измельчают в ступке в сухом виде, помещают в 20 мл раствора полимера (5%-ный раствор ацетилфталилцеллюлозы) в стакан и диспергируют в течение 10 мин на магнитной мешалке. Затем в реактор (химический стакан) наливают 150 мл вазелинового масла. Опускают в стакан установку с якорной мешалкой и включают оборудование.

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

² Пат. РФ RU 2756009C1. Способ получения средства, обладающего противовоспалительной активностью: патент на изобретение / Д.Ю. Апушкин, А.И. Андреев, Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, И.П. Рудакова, В.В. Новикова, дата опубликования: 24.09.2021.

Полученная суспензия ЛС тонкой струей вливается в реактор при работающей якорной мешалке и перемешивается в течение 15 мин при 20 °С и скорости вращения 800 об./мин, не допуская выброса смеси. Для отверждения оболочек (удаления легколетучего растворителя) температуру поднимают до 40 °С из расчета на 5 °С через 20 мин при постоянно работающей мешалке. После отвердевания (микрокапсулы не расплющиваются при нажатии стеклянной палочкой на фильтровальной бумаге) мешалка отключается. Полученные микрокапсулы отделяют от дисперсионной среды (вазелинового масла) с помощью сетки с размером отверстий 0,2 мм. Отделенные от масла микрокапсулы 3 раза промывают гексаном (по 15–20 мл на порцию). Готовые микрокапсулы оставляют сушить на воздухе при комнатной температуре.

Определение содержания процианидинов. Определение содержания процианидинов в стробилах ели обыкновенной и сухих экстрактах проводили с помощью кислотного расщепления процианидинов до антоцианидинов по методу Портера [12, 13].

Навеску экстракта около 0,2 г (точная навеска) (навеску 1,0 г стробилов с размером частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,5 мм) помещали в круглодонную колбу вместимостью 100 мл. Добавляли 20 мл 60%-ного спирта этилового, закрывали пробкой и взвешивали с погрешностью ± 0,01 г. Присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 80 °С в течение 15 мин (40 мин для шишек). После охлаждения до комнатной температуры колбу с пробкой взвешивали и доводили до первоначальной массы спиртом этиловым 60%-ным. Содержимое колбы центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 2000–3000 об./мин, 0,1 мл полученного извлечения перенесли в круглодонную колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 0,9 мл 60%-ного спирта этилового, 6 мл бутанола кислого, 0,2 мл железосодержащего реактива, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 80 °С в течение 50 мин. Полученный раствор охлаждали при комнатной температуре.

Измеряли оптическую плотность раствора на спектрофотометре марки СФ 2000 при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 1 мл 60%-ного спирта этилового, 6 мл бутанола кислого и 0,2 мл железосодержащего реактива.

Содержание процианидинов в пересчете на цианидина хлорид (в %) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot 20 \cdot 7,2 \cdot 100}{136 \cdot m \cdot 0,1 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора;
136 – удельный показатель поглощения $E_{1\%}^{1\text{см}}$

цианидина хлорида;

m – масса сырья (экстракта), г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

В эксперименте использовались белые лабораторные аутбредные крысы стока линии Wistar и белые лабораторные аутбредные мыши стока линии ICR (CD-1). Подготовка животных включала отбор по полу, возрасту и состоянию здоровья. В рамках выделенной субпопуляции был выполнен рандомизированный отбор с использованием генератора случайных чисел в экспериментальные группы: группу препарата сравнения (диклофенак натрия) и контрольную группу. Минимальный размер группы – шесть животных³. Животные в группах маркировались методом нанесения сквозных индивидуальных меток. Проверка качества рандомизации выполнялась на основе тестирования значимости сдвигов масс и гомогенности дисперсий – до эксперимента.

Дизайн экспериментов на животных. Сухой экстракт стробилов ели растворяли в 0,9%-ном физиологическом растворе NaCl или 2%-ном растворе пищевого крахмала и вводили животным внутрибрюшинно, перорально или ректально в дозах 100 (внутрилабораторный стандарт скрининговой дозы), 50 или 10 мг/кг за 40 мин до введения 1%-ного раствора каррагинина (Sigma Aldrich, USA). В качестве препарата сравнения использовали таблетки диклофенак натрия 0,05 г, покрытые кишечнорастворимой оболочкой, производства ООО «Озон», г. Жигулёвск. Препарат сравнения растворяли в 0,9%-ном физиологическом растворе NaCl или 2%-ном растворе пищевого крахмала и вводили животным. В качестве эквистрессового воздействия животным в контрольной группе вводились 0,9%-ный физиологический раствор NaCl или 2%-ный крахмальный раствор. Для ректальной формы эталонная группа отсутствовала, а контрольная группа получала 2%-ный крахмальный раствор в равном (с опытной группой) объеме. Твердую лекарственную форму из растительного экстракта (микрокапсулы) вводили перорально, предварительно суспензивав их в 2%-ном растворе пищевого крахмала. Дозу для животного определяли из расчета активного вещества (экстракт шишек ели), содержащегося в лекарственной форме. Острая воспалительная реакция моделировалась путем субплантарного введения 0,1 мл 1%-ного раствора каррагинина. Увеличение объема стопы, свидетельствующее о развитии отека, оценивали с помощью водного плетизмометра и безводного плетизмометра, где применяется оптическая трехмерная измерительная система [14, 15]. Противовоспалительный эффект оценивался по

³ Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: уч. пособие / под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2 изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 826 с.

уменьшению объема отека в экспериментальных группах по сравнению с контрольной. Для оценки противовоспалительной активности веществ использовали следующие показатели:

1. Значение процента прироста. Характеризует степень увеличения объема лапы в экспериментальной группе по сравнению с контролем, вычисляется по формуле

$$X = \frac{a}{b} \cdot 100 \%,$$

где X – значение процента прироста; a – фоновое значение объема лапы; b – значение объема лапы через 1 / 3 / 5 ч после введения каррагинина.

2. Значение процента торможения отека. Характеризует способность вещества тормозить развитие воспаления или уменьшать количество экссудата, который выходит из кровеносных сосудов в область воспаления. Вычисляется по формуле

$$Y = \frac{c}{d} \cdot 100 \%,$$

где Y – значение процента торможения отека; c – медианное значение процента прироста объема лапы контрольной группы через 1 / 3 / 5 ч после введения каррагинина; d – медианное значение процента прироста объема лапы экспериментальной группы через 1 / 3 / 5 ч после введения каррагинина.

Для обработки данных экспериментов использовался непараметрический двусторонний тест Вилкоксона для независимых выборок (two-sided Wilcoxon signed-rank test), поправки на множественные сравнения не вводились⁴ [16]. Значения выбросов выявлялись и исключались в соответствии с правилом 1,5 IQR (outliers removed using 1.5*interquartile range rule).

Результаты и их обсуждение. На первом этапе работы нами проведено исследование содержания процианидинов в ели обыкновенной стробилах и двух видах экстрактов. В экстракте, полученном по способу, описанному в патенте № 2756009С1, также был получен экстракт по методике, представленной в патенте, но без стадии холодного осаждения (стандартная горячеводная экстракция). Наличие в экстракте дубильных веществ конденсированной группы было предварительно доказано с помощью качественных реакций: реакцией с 1%-ным раствором железомоноаммониевых квасцов и пробой Стиасни. Для количественного определения процианидинов использовали модифицированный метод Портера [12], в основе которого лежит кислотное расщепление процианидинов до антоцианидинов. Результаты исследования представлены в табл. 1.

По результатам исследования установлено, что содержание процианидинов в образцах ели обыкновенной

стробиллов составляет около 13 %. Схема получения сухого водного экстракта ели обыкновенной стробиллов, указанная в патенте № 2756009С1, позволяет получить субстанцию с содержанием процианидинов более чем в 3 раза выше, в сравнении с содержанием в экстракте ели обыкновенной стробиллов без удаления осадка. Существенное увеличение содержания процианидинов может оказать влияние на фармакологическую активность, поскольку с процианидинами связывают многие виды активности, включая противовоспалительную [9].

Таблица 1

Содержание процианидинов в шишках ели обыкновенной и горячеводных экстрактах

Образец	Содержание процианидинов, %
Стробиллы ели обыкновенной	13,21 ± 1,57
Горячеводный экстракт с удалением осадка (Патент RU 2756009С1)	56,75 ± 2,53
Горячеводный экстракт без удаления осадка	18,61 ± 0,65

Проведено исследование противовоспалительной активности полученного экстракта при внутрибрюшинном введении. Результаты исследования представлены в табл. 2.

В табл. 2 представлены данные по эксперименту, целью которого было определить наличие выраженной противовоспалительной активности сухого экстракта стробиллов ели обыкновенной. Экстракт стробиллов ели проявил ярко выраженную противовоспалительную активность при внутрибрюшинном введении крысам. Более того, следует отметить, что эффект был настолько сильным, что сама модель каррагининового отека не смогла развиваться, чего нельзя сказать о группе контроля или препарате сравнения. В качестве препарата сравнения использовали диклофенак, поскольку он является одним из самых популярных нестероидных противовоспалительных средств на сегодняшний день. Диклофенак проявил выраженную противовоспалительную активность, но противовоспалительное действие экстракта шишек ели оказалось выше, особенно на третьем часу эксперимента. Такая картина наблюдалась как при фотометрическом измерении, так и при гидрометрическом.

RR (относительный риск) развития прироста отека лапы крысы у группы, получающей диклофенак, относительно группы, получающей экстракт шишек ели, на первом часу составляет 2,94, на третьем часу – 3,94, на пятом часу – 4,88. *OR* (отношение шансов) показало, что прирост воспаления произойдет в группе, получающей диклофенак, в сравнении с группой, получающей экстракт стробиллов ели, на первом часу – 5, на третьем – 10,15, на

⁴ Hollander M., Wolfe D.A., Chicken E. Nonparametric Statistical Methods. – Canada: John Wiley & Sons, 2013. – 848 p.

Таблица 2

Противовоспалительная активность экстракта шишек ели при внутрибрюшинном введении крысам

Шифр вещества / доза	Способ введения	Способ оценки	Процент торможения отека					
			1 ч	<i>p</i> -value	3 ч	<i>p</i> -value	5 ч	<i>p</i> -value
Экстракт стробилов ели 100 мг/кг	в/б	Фото	> 95	0,020	99,6	0,004	> 95	0,005
Экстракт стробилов ели 100 мг/кг	в/б	Гидро	84,6	0,004	> 95	0,004	93,8	0,004
Диклофенак	в/б	Фото	67,9	0,2403	61,8	0,0411	55,3	0,0651
Диклофенак	в/б	Гидро	86,1	0,0022	72,1	0,0050	45,1	0,0022

Примечание: *в/б – внутрибрюшинно; Фото – измерение с помощью безводного плетизмометра, где применяется оптическая трехмерная измерительная система; Гидро – измерение с помощью водного плетизмометра; *p* (Wilcoxon signed-rank test) – *p*-значение по критерию Манна – Уитни. Жирным шрифтом выделены значения *p*-value < 0,05.

пятом часу – 24,4. Это говорит о более выраженном противовоспалительном действии экстракта стробилов ели в сравнении с диклофенаком. Применение экстракта стробилов ели позволяет минимизировать риски развития воспалительной реакции.

Для подтверждения эффективности экстракта стробилов ели как противовоспалительного средства представляло интерес исследовать противовоспалительную активность на разных видах животных. В качестве второго модельного животного использовали мышей линии CD-1. Результаты исследования противовоспалительной активности экстракта стробилов ели у мышей представлены в табл. 3.

Результаты эксперимента свидетельствуют о ярко выраженной противовоспалительной активности экстракта стробилов ели, подтвердившейся в скрининговых экспериментах на двух видах животных при оценке объема отека двумя взаимно независимыми инструментальными методами.

В табл. 4 представлены данные по эксперименту, целью которого было определить минимальную эффективную дозу (для уменьшения количества используемого вещества), которая будет так же эффективно подавлять саму модель воспаления. Для

этого была взята небольшая дозовая развертка: 50 мг/кг и 10 мг/кг (данные по дозе 100 мг/кг присутствуют в предыдущем эксперименте).

Из табл. 4 видно, что при внутрибрюшинном введении крысам дозы 50 мг/кг происходит значительное и статистически значимое подавление воспалительной реакции. Доза 50 мг/кг экстракта стробилов ели может быть использована в качестве замены дозы в 100 мг/кг. Доза 10 мг/кг, согласно данным гидрометрии, подавляет воспаление (50 % подавления отека) на первом и третьем часе после введения каррагинина (*p* < 0,05), однако данные фотометрии это не подтверждают.

Следующим этапом нашей работы стало исследование противовоспалительной активности экстракта стробилов ели при пероральном введении. Для того чтобы уменьшить влияние агрессивной среды желудка на экстракт стробилов ели, использовали микрокапсулирование. Не менее интересен и ректальный способ введения, поскольку многие противовоспалительные препараты применяются в виде суппозитория. Результаты исследований при пероральном и ректальном пути введения представлены в табл. 5.

Таблица 3

Противовоспалительная активность экстракта стробилов ели при внутрибрюшинном введении мышам

Группа	1 ч		4 ч	
	Процент прироста	Процент торможения	Процент прироста	Процент торможения
Контроль	26,67	<i>p</i> -value	-	-
Экстракт шишек	12,75	0,0021	52,2	66,0
Диклофенак	11,49	0,0297	56,9	32,0

Примечание: **p* (Wilcoxon signed-rank test) – *p*-значение по критерию Манна – Уитни. Жирным шрифтом выделены значения *p*-value < 0,05.

Таблица 4

Противовоспалительная активность экстракта стробилов ели при внутрибрюшинном введении (снижение дозы)

Шифр вещества	Способ введения	Способ оценки	Процент торможения отека					
			1 ч	<i>p</i> -value	3 ч	<i>p</i> -value	5 ч	<i>p</i> -value
Экстракт стробилов ели 50 мг/кг	в/б	Гидро	> 95	0,004	> 95	0,004	> 95	0,004
Экстракт стробилов ели 10 мг/кг	в/б	Гидро	58,5	0,001	50,2	0,001	17,9	0,001
Экстракт стробилов ели 50 мг/кг	в/б	Фото	> 95	0,032	> 95	0,008	> 95	0,008
Экстракт стробилов ели 10 мг/кг	в/б	Фото	28,2	0,329	39,4	0,082	5	0,792

Примечание: * в/б – внутрибрюшинно; Фото – измерение с помощью безводного плетизмометра, где применяется оптическая трехмерная измерительная система; Гидро – измерение с помощью водного плетизмометра; *p* (Wilcoxon signed-rank test) – *p*-значение по критерию Манна – Уитни. Жирным шрифтом выделены значения *p*-value < 0,05.

Противовоспалительная активность экстракта шишек ели при пероральном и ректальном введении

Шифр вещества	Способ введения	Способ оценки	Различие опытной и контрольной группы (Значение <i>p</i> -value)		
			1 ч	3 ч	5 ч
Экстракт стробилов ели 50 мг/кг	Перорально	Фото	0,862	0,728	0,281
Микрогранулы с экстрактом стробилов ели	Перорально	Фото	0,731	0,731	0,731
Экстракт стробилов ели	Ректально	Фото	0,429	0,177	0,247

Примечание: *Фото – измерение с помощью безводного плетизмометра, где применяется оптическая трехмерная измерительная система; *p* (Wilcoxon signed-rank test) – *p*-значение по критерию Манна – Уитни.

Пероральное введение исследуемого экстракта не оказывает существенного влияния на воспалительную реакцию. При оценке перорального воздействия сухого водного экстракта ели обыкновенной стробилов с первого по пятый час не установлено статистически значимого отличия от данных контрольной группы в торможении воспаления. Аналогично в результате эксперимента с ректальным введением не выявлено статистически значимого различия с показателями контрольной группы по уровню противовоспалительной активности. Пероральное применение микрокапсул с экстрактом стробилов ели также не способствовало уменьшению выраженности каррагининового отека.

В результате исследования установлено, что при использовании методики, где присутствует стадия удаления осадка путем резкой смены температуры, происходит концентрирование процианидинов. Содержание процианидинов при использовании указанной методики выше, чем при использовании стандартной горячеводной экстракции.

Процианидины являются одной из основных групп биологически активных веществ в экстракте стробилов ели. Противовоспалительное действие процианидинов связывают со способностью снижать выработку активных форм кислорода в очаге воспаления. Активные формы кислорода участвуют в активации сигнальной системы NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) и сигнального пути MAPK (mitogen-activated protein kinase). Сигнальный путь MAPK определяет экспрессию различных генов путем регулирования некоторых провоспалительных факторов [17].

Внутрибрюшинное введение экстракта стробилов ели приводит к достоверному торможению воспалительной реакции в сравнении с контрольными данными. Противовоспалительная активность экстракта шишек ели подтверждена на двух видах животных при введении трех уровней доз (100, 50, 10 мг/кг) и с использованием для измерения водного и безводного плетизмометра. Это исследование может являться отправной точкой в разработке противовоспалительных лекарственных средств для использования в медицинской и ветеринарной практике.

В литературных источниках имеются противоречивые данные о всасывании процианидинов из

желудочно-кишечного тракта. Одни исследования утверждают, что процианидины способны всасываться из желудочно-кишечного тракта и подвергаются глюкуронированию и сульфатированию [18, 19]. В других исследованиях, напротив, имеются данные, согласно которым процианидины обладают очень низкой биодоступностью [20]. Биодоступность может оказывать влияние и на выраженность противовоспалительного действия экстракта. В нашем исследовании показано, что пероральное введение исследуемого экстракта не приводит к торможению воспалительной реакции. Однако следует отметить, что экстракт животным вводили однократно, длительное введение экстракта не оценивалось. В источниках литературы говорится о том, что введение процианидина D1 в течение 23 дней приводило к торможению воспалительной реакции на фоне ревматоидного артрита [5]. Это указывает, что исследуемый экстракт, богатый процианидинами, не проявляет быстрого и выраженного противовоспалительного действия при однократном приеме внутрь, но может быть эффективным при длительном пероральном применении.

В среде желудочного сока многие вещества разрушаются или меняют свою структуру. Для того чтобы уменьшить воздействие желудочного сока на экстракт стробилов ели, были получены микрокапсулы с ацетилфталилцеллюлозой. Микрокапсулы представляют собой капсулы, состоящие из тонкой оболочки ацетилфталилцеллюлозы, шарообразной или неправильной формы. Применение такого подхода позволяет получить кишечнорастворимые микрокапсулы. В результате исследования установлено, что микрокапсулирование не привело к увеличению противовоспалительной активности экстракта стробилов ели при пероральном применении. Это говорит о том, что отсутствие выраженной противовоспалительной активности у экстракта стробилов ели не связано с возможными изменениями структуры веществ в желудочно-кишечном тракте.

Выводы. По результатам исследования установлено, что сухой водный экстракт ели обыкновенной стробилов, полученный по оригинальной методике, содержит значительное количество процианидинов. В результате экспериментов на лабораторных животных установлено, что исследуемый

экстракт обладает выраженной противовоспалительной активностью при внутрибрюшинном введении. Исследуемый экстракт проявляет активность на двух видах животных. При пероральном применении и введении экстракта ректально выраженной противовоспалительной активности не установлено. Особенности всасывания экстракта ели обыкновенной стробилов и пероральное применение в качестве

противовоспалительного средства требуют более глубокого изучения.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2023 г.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Список литературы

1. Rastogi S., Arora V., Bhalla V. Pycnogenol: the hercules of antioxidants // *Indian J. Drugs.* – 2015. – Vol. 3. – P. 5–10.
2. Santos-Buelga C., Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health // *J. Sci. Food Agric.* – 2000. – Vol. 80, № 7. – P. 1094–1117.
3. Grape seed procyanidin B2 ameliorates hepatic lipid metabolism disorders in db/db mice / M. Yin, P. Zhang, F. Yu, Z. Zhang, Q. Cai, W. Lu, B. Li, W. Qin [et al.] // *Molecular Medicine Reports.* – 2017. – Vol. 16, № 3. – P. 2844–2850. DOI: 10.3892/mmr.2017.6900
4. Trimer procyanidin oligomers contribute to the protective effects of cinnamon extracts on pancreatic β -cells in vitro / P. Sun, T. Wang, L. Chen, B.-W. Yu, Q. Jia, K.-X. Chen, H.-M. Fan, Y.-M. Li, H.-Y. Wang // *Acta Pharmacol. Sin.* – 2016. – Vol. 37, № 8. – P. 1083–1090. DOI: 10.1038/aps.2016.29
5. Cinnamtannin D1 attenuates autoimmune arthritis by regulating the balance of Th17 and Treg cells through inhibition of Aryl Hydrocarbon Receptor expression / C. Shi, H. Zhang, X. Wang, B. Jin, Q. Jia, Y. Li, Y. Yang // *Pharmacol. Res.* – 2019. – Vol. 151. – P. 104513. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104513
6. Cinnamtannin B-1 promotes migration of mesenchymal stem cells and accelerates wound healing in mice / K. Fujita, K. Kuge, N. Ozawa, S. Sahara, K. Zaiki, K. Nakaoji, K. Hamada, Y. Takenaka [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, № 12. – P. e0144166. DOI: 10.1371/journal.pone.0144166
7. A comparative anticancer study on procyanidin C1 against receptor positive and receptor negative breast cancer / L.L. Koteswari, S. Kumari, A.B. Kumar, R.R. Malla // *Nat. Prod. Res.* – 2019. – Vol. 34, № 22. – P. 3267–3274. DOI: 10.1080/14786419.2018.1557173
8. Immunosuppressive effects of A-type procyanidin oligomers from *Cinnamomum tamala* / L. Chen, Y. Yang, P. Yuan, Y. Yang, K. Chen, Q. Jia, Y. Li // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 365258. DOI: 10.1155/2014/365258
9. Diouf P.N., Stevanovic T., Cloutier A. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions // *Food Chemistry.* – 2009. – Vol. 113, № 4. – P. 897–902. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.08.016
10. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of type-A procyanidine polyphenols from bark of *Cinnamomum zeylanicum* in rats / S. Vetal, S.L. Bodhankar, V. Mohan, P.A. Thakurdesai // *Food Science and Human Wellness.* – 2013. – Vol. 2, № 2. – P. 59–67. DOI: 10.1016/j.fshw.2013.03.003
11. Pahwa R., Goyal A., Jialal I. Chronic Inflammation // *StatPearls.* – Treasure Island (FL): StatPearls Publ., 2023.
12. Porter L.J., Hrstich L.N., Chan B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin // *Phytochemistry.* – 1986. – Vol. 25, № 1. – P. 223–230. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)94533-3
13. *Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 21* / ed. by Atta-ur-Rahman. – Amsterdam: Elsevier Science, 2000. – 812 p. – P. 497–570.
14. Апушкин Д.Ю., Андреев А.И., Коваленко И.И. Оптический (безводный) плетизмометр повышает эффективность доклинических исследований противовоспалительной активности новых соединений // Восьмая конференция Rus-LASA: программа и тезисы докладов. – Пушино, 1–3 октября, 2020. – С. 12–13.
15. Апушкин Д.Ю., Андреев А.И., Ахременко Е.А. Исследование противовоспалительной активности экстракта шишек ели обыкновенной с помощью безводного плетизмометра // Девятая научно-практическая конференция специалистов по работе с лабораторными животными (Rus-LASA-9): тезисы докладов. – Сколково, 2–4 декабря, 2021.
16. Anderson M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance // *Austral Ecology.* – 2001. – Vol. 26, № 1. – P. 32–46.
17. Procyanidin dimer B1 and trimer C1 impair inflammatory response signalling in human monocytes / X. Terra, P. Palozza, J. Fernandez-Larrea, A. Ardevol, C. Blade, G. Pujadas, J. Salvado, L. Arola, M.T. Blay // *Free Radic. Res.* – 2011. – Vol. 45, № 5. – P. 611–619. DOI: 10.3109/10715762.2011.564165
18. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats / C. Tsang, C. Auger, W. Mullen, A. Bornet, J.-M. Rouanet, A. Crozier, P.-L. Teissedre // *Br. J. Nutr.* – 2005. – Vol. 94, № 2. – P. 170–181. DOI: 10.1079/bjn20051480
19. Methylation of catechins and procyanidins by rat and human catechol-o-methyltransferase: Metabolite profiling and molecular modeling studies / C.H. Weinert, S. Wiese, H.M. Rawel, T. Esatbeyoglu, P. Winterhalter, T. Homann, S.E. Kulling // *Drug Metab. Dispos.* – 2012. – Vol. 40, № 2. – P. 353–359. DOI: 10.1124/dmd.111.041871
20. Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract / A. Sano, J. Yamakoshi, S. Tokutake, K. Tobe, Y. Kubota, M. Kikuchi // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2003. – Vol. 67, № 5. – P. 1140–1143. DOI: 10.1271/bbb.67.1140

Экстракт стробилов ели обыкновенной как перспективное средство для минимизации рисков развития воспаления / Д.К. Гуляев, Д.Ю. Апушкин, А.И. Андреев, А.С. Сульдин, П.С. Маценко, Т.А. Утушкина, К.Е. Якушина // Анализ риска здоровью. – 2023. – № 3. – С. 163–171. DOI: 10.21668/health.risk/2023.3.16



Research article

EXTRACT OF EUROPEAN SPRUCE STROBILES AS A PROMISING TOOL TO MINIMIZE THE RISKS OF INFLAMMATION

D.K. Gulyaev, D.Yu. Apushkin, A.I. Andreev, A.S. Suldin, P.S. Mashchenko, T.A. Utushkina, K.E. Yakushina

Perm State University, 15 Bukireva St., Perm, 614068, Russian Federation

The article is devoted to examining anti-inflammatory activity of dry aqueous extract of European spruce (Picea abies) strobiles using different routes of administration.

Strobiles of European spruce for extracts were harvested on the territory of the Perm region of the Russian Federation in a mixed forest with a predominance of European spruce and Scots pine (Pinus sylvestris). Dry aqueous extract was obtained according to the original patented method. Procyanidins content in spruce strobiles and dry extracts was determined by using acid cleavage of procyanidins to anthocyanidins according to the Porter method. Anti-inflammatory activity was established by using carrageenan-induced paw edema in rats. White laboratory outbred Wistar rats were used in the experiment.

According to the results of the study, the procyanidin content was found to equal approximately 13 % in the samples of spruce strobiles. Intraperitoneal administration of dry extract of strobile spruce at a dose of 100 mg/kg was established to induce a pronounced anti-inflammatory activity. Intraperitoneal administration of smaller doses of strobile extract resulted in a pronounced anti-inflammatory activity at a dose of 50 mg/kg. A dose of 10 mg/kg successfully suppressed inflammation (50 % edema suppression) 1 and 3 hours after carrageenan administration ($p < 0.05$) according to hydrometric data, but this was not confirmed by photometric data. Oral administration of the extract showed no anti-inflammatory activity. With the rectal route of administration, no pronounced anti-inflammatory activity was found in the studied extract.

The extract of spruce strobiles obtained by the original method contains 56 % procyanidins and exhibits pronounced anti-inflammatory activity when administered intraperitoneally. The use of the extract in oral and rectal routes of administration requires more in-depth study.

Keywords: European spruce, strobiles, dry extract, procyanidines, intraperitoneal administration, oral administration, rectal administration, anti-inflammatory activity.

References

1. Rastogi S., Arora V., Bhalla V. Pycnogenol: the hercules of antioxidants. *Indian J. Drugs.*, 2015, vol. 3, pp. 5–10.
2. Santos-Buelga C., Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, vol. 80, no. 7, pp. 1094–1117.
3. Yin M., Zhang P., Yu F., Zhang Z., Cai Q., Lu W., Li B., Qin W. [et al.]. Grape seed procyanidin B2 ameliorates hepatic lipid metabolism disorders in db/db mice. *Molecular Medicine Reports*, 2017, vol. 16, no. 3, pp. 2844–2850. DOI: 10.3892/mmr.2017.6900
4. Sun P., Wang T., Chen L., Yu B.W., Jia Q., Chen K., Fan H., Li Y., Wang H. Trimer procyanidin oligomers contribute to the protective effects of cinnamon extracts on pancreatic β -cells in vitro. *Acta Pharmacol. Sin.*, 2016, vol. 37, no. 8, pp. 1083–1090. DOI: 10.1038/aps.2016.29

© Gulyaev D.K., Apushkin D.Yu., Andreev A.I., Suldin A.S., Mashchenko P.S., Utushkina T.A., Yakushina K.E., 2023
Dmitri K. Gulyaev – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Head of the Training and Production Laboratory of the Faculty of Chemistry (e-mail: dkg2014@mail.ru; tel.: +7 (902)-807-10-04; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9464-1869>).

Danila Yu. Apushkin – Senior Lecturer at the Department of Pharmacology and Pharmacy (e-mail: apushkin-job@gmail.com; tel.: +7 (342) 239-64-01; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4459-5264>).

Alexander I. Andreev – Senior Lecturer at the Department of Pharmacology and Pharmacy (e-mail: mniium@yandex.ru; tel.: +7 (342) 239-64-01; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3718-4830>).

Alexander S. Suldin – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor at the Department of Pharmacology and Pharmacy (e-mail: suldin@mail.ru; tel.: +7 (342) 239-64-01; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4366-7772>).

Petr S. Mashchenko – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor at the Department of Pharmacology and Pharmacy (e-mail: petlya11@mail.ru; tel.: +7 (342) 239-64-01; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2259-7659>).

Taisiya A. Utushkina – student (e-mail: tais.utu@mail.ru; tel.: +7 (342) 239-64-01; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6314-1850>).

Karolina E. Yakushina – student (e-mail: yakushinake@psu.ru; tel.: +7 (912) 491-32-77; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3050-0220>).

5. Shi C., Zhang H., Wang X., Jin B., Jia Q., Li Y., Yang Y. Cinnamtannin D1 attenuates autoimmune arthritis by regulating the balance of Th17 and Treg cells through inhibition of Aryl Hydrocarbon Receptor expression. *Pharmacol. Res.*, 2020, vol. 151, pp. 104513. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104513
6. Fujita K., Kuge K., Ozawa N., Sahara S., Zaiki K., Nakaoji K., Hamada K., Takenaka Y. [et al.]. Cinnamtannin B-1 promotes migration of mesenchymal stem cells and accelerates wound healing in mice. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 12, pp. e0144166. DOI: 10.1371/journal.pone.0144166
7. Koteswari L.L., Kumari S., Kumar A.B., Malla R.R. A comparative anticancer study on procyanidin C1 against receptor positive and receptor negative breast cancer. *Nat. Prod. Res.*, 2019, vol. 34, no. 22, pp. 3267–3274. DOI: 10.1080/14786419.2018.1557173
8. Chen L., Yang Y., Yuan P., Yang Y., Chen K., Jia Q., Li Y. Immunosuppressive effects of A-type procyanidin oligomers from *Cinnamomum tamala*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2014, vol. 2014, pp. 365258. DOI: 10.1155/2014/365258
9. Diouf P.N., Stevanovic T., Cloutier A. Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions. *Food Chemistry*. 2009, vol. 113, no. 4, pp. 897–902. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.08.016
10. Vetal S., Bodhankar S.L., Mohan V., Thakurdesai P.A. Anti-inflammatory and anti-arthritis activity of type-A procyanidine polyphenols from bark of *Cinnamomum zeylanicum* in rats. *Food Science and Human Wellness*, 2013, vol. 2, no. 2, pp. 59–67. DOI: 10.1016/j.fshw.2013.03.003
11. Pahwa R., Goyal A., Jialal I. Chronic Inflammation. *StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publ., 2023.
12. Porter L.J., Hrstich L.N., Chan B.G. The conversion of procyanidins and prodelfinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 1986, vol. 25, no. 1, pp. 223–230. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)94533-3
13. Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 21. In: Atta-ur-Rahman ed. Amsterdam, Elsevier Science, 2000, 812 p., pp. 497–570.
14. Apushkin D.Yu., Andreev A.I., Kovalenko I.I. Opticheskie (bezvodny) pletizmometr povyshaet effektivnost' doklinicheskikh issledovaniy protivovospalitel'noi aktivnosti novykh soedinenii [Optical (anhydrous) plethysmometer improves the efficiency of preclinical studies of the anti-inflammatory activity of new compounds]. *Vos'maya konferentsiya Rus-LASA: programma i tezisy dokladov*, Pushchino, October 1–3, 2020, pp. 12–13 (in Russian).
15. Apushkin D.Yu., Andreev A.I., Akhremenko E.A. Issledovanie protivovospalitel'noi aktivnosti ekstrakta shishek eli obyknovЕННОЙ s pomoshch'yu bezvodnogo pletizmometra [Study of the anti-inflammatory activity of Norway spruce cone extract using an anhydrous plethysmometer]. *Devyataya nauchno-prakticheskaya konferentsiya spetsialistov po rabote s laboratornymi zhivotnymi (Rus-LASA-9): tezisy dokladov*, Skolkovo, December 2–4, 2021 (in Russian).
16. Anderson M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral. Ecology*, 2001, vol. 26, no. 1, pp. 32–46.
17. Terra X., Palozza P., Fernandez-Larrea J., Ardevol A., Blade C., Pujadas G., Salvado J., Arola L., Blay M.T. Procyanidin dimer B1 and trimer C1 impair inflammatory response signalling in human monocytes. *Free Radic. Res.*, 2011, vol. 45, no. 5, pp. 611–619. DOI: 10.3109/10715762.2011.564165
18. Tsang C., Auger C., Mullen W., Bornet A., Rouanet J.-M., Crozier A., Teissedre P.-L. The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *Br. J. Nutr.*, 2005, vol. 94, no. 2, pp. 170–181. DOI: 10.1079/bjn20051480
19. Weinert C.H., Wiese S., Rawel H.M., Esatbeyoglu T., Winterhalter P., Homann T., Kulling S.E. Methylation of catechins and procyanidins by rat and human catechol-o-methyltransferase: Metabolite profiling and molecular modeling studies. *Drug Metab. Dispos.*, 2012, vol. 40, no. 2, pp. 353–359. DOI: 10.1124/dmd.111.041871
20. Sano A., Yamakoshi J., Tokutake S., Tobe K., Kubota Y., Kikuchi M. Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003, vol. 67, no. 5, pp. 1140–1143. DOI: 10.1271/bbb.67.1140

Gulyaev D.K., Apushkin D.Yu., Andreev A.I., Suldin A.S., Mashchenko P.S., Utushkina T.A., Yakushina K.E. Extract of european spruce strobiles as a promising tool to minimize the risks of inflammation. *Health Risk Analysis*, 2023, no. 3, pp. 163–171. DOI: 10.21668/health.risk/2023.3.16.eng

Получена: 05.05.2023

Одобрена: 11.09.2023

Принята к публикации: 22.09.2023