

РАНОЗАЖИВЛЯЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА *PRUNELLA GRANDIFLORA* L.

Е.В. Болотник^{1,*}, Л.И. Алексеева¹, Л.П. Ларионов²

¹ ФГБУН «Ботанический сад» Уральского отделения РАН,
620144, Российская Федерация, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202-а

² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России,
620028, Российская Федерация, Екатеринбург, ул. Репина, 3

Изучен качественный состав фенольных кислот и ранозаживляющая активность экстракта *Prunella grandiflora* L. С помощью ВЭЖХ в сухом экстракте *P. grandiflora* определили содержание розмариновой (621 ± 5 мг/г), кофейной ($11,2 \pm 0,2$ мг/г), сиреневой ($46,5 \pm 1,4$ мг/г), п-кумаровой ($25,8 \pm 0,5$ мг/г), феруловой ($42,7 \pm 2,9$ мг/г) кислоты. На основе данного экстракта были разработаны три различных по составу противоожоговых средства с 5% сухим экстрактом *Prunella grandiflora* L. и апробированы на модели термического ожога II–IIIa степени у крыс самцов популяции линий Wistar. Проведена оценка восстановления кожных покровов в опытных группах животных и в контроле. Выявлено, что восстановление эпителия и покрытие шерстью в группах крыс, леченных экспериментальными мягкими лекарственными формами, происходит раньше, чем в группах, леченных основами без экстракта на 6–8 дней. Установлено, что приготовленные мягкие лекарственные формы на основе экстракта *P. grandiflora* обладают противовоспалительным и ранозаживляющим действием.

Ключевые слова: ожоги, противоожоговая активность, *Prunella grandiflora* L., черноголовка крупноцветковая, розмариновая кислота

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Болотник Е.В., Алексеева Л.И., Ларионов Л.П. Ранозаживляющая активность экстракта *Prunella grandiflora* L. Биомедицина. 2021;17(4):50–56. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-50-56>

Поступила 17.02.2021

Принята после доработки 01.04.2021

Опубликована 10.12.2021

BURN WOUND HEALING ACTIVITY OF *PRUNELLA* *GRANDIFLORA* L. EXTRACT

Elizaveta V. Bolotnik^{1,*}, Lyudmila I. Alekseeva¹, Leonid P. Larionov²

¹ Botanical Garden of the Ural Branch of RAS
620144, Russian Federation, Ekaterinburg, 8 Marta Str., 202-a

² Ural State Medical University
620028, Russian Federation, Ekaterinburg, Repina Str., 3

The qualitative composition of phenolic acids and burn wound healing activity of *Prunella grandiflora* L. extract were studied. The content of rosmarinic (621 ± 5 mg/g), caffeic (11.2 ± 0.2 mg/g), syringic (46.5 ± 1.4 mg/g), n-coumaric (25.8 ± 0.5 mg/g), and ferulic (42.7 ± 2.9 mg/g) acids in dry extracts of *P. grandiflora* was determined by HPLC. Three new burn-healing agents of different composition containing 5% of the dry extract of *Prunella grandiflora* L. (big-flowered self-heal) were developed. The developed agents were tested on male Wistar rats with second- and third-degree thermal burns. An assessment of skin restoration

was carried out in experimental and control groups of animals. It was revealed that animals treated with the developed soft dosage forms restored the epithelium and coat 6–8 days faster than those treated with compositions containing no extract under study. It was found that the developed soft dosage forms based on *P. grandiflora* extract exhibit anti-inflammatory and wound-healing action.

Keywords: burns, burn-healing activity, *Prunella grandiflora* L., big-flowered self-heal, rosmarinic acid

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Bolotnik E.V., Alekseeva L.I., Larionov L.P. Burn Wound Healing Activity of *Prunella Grandiflora* L. Extract. *Journal Biomed.* 2021;17(4):50–56. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-4-50-56>

Submitted 17.02.2021

Revised 01.04.2021

Published 10.12.2021

Введение

В настоящее время используется множество современных лекарственных средств (ЛС) для лечения больных с термическими ожогами, ряд из которых содержат биологически активные вещества (БАВ) растительного происхождения [1, 7, 8]. Современные исследования показывают, что синтетические лекарственные препараты при местном применении нередко сравнимы с препаратами растительного происхождения, содержащими БАВ, в лечении ожогов и сроках полного излечения. Кроме того, препараты растительного происхождения при длительном применении в меньшей степени вызывают сенсibilизацию и аллергические реакции организма, которые легко обратимы [9, 10]. Поэтому расширение арсенала лекарственных средств для лечения больных с поверхностными термическими ожогами на основе лекарственного растительного сырья является актуальным.

В этом аспекте значительный интерес представляют известные в народной медицине виды рода *Prunella* *Prunella vulgaris* L. и *Prunella grandiflora* L. Водные извлечения из надземной части *Prunella vulgaris* L. широко используются как ранозаживляющее, противовоспалительное, антимикробное, жаропонижающее, отхаркивающее, тонизирующее и антикомплемментарное средство [11, 13].

Ранее нами показано, что содержание розмариновой кислоты в растениях черноголовки крупноцветковой *P. grandiflora* выше, чем в черноголовке обыкновенной *P. vulgaris* [2]. Как известно, розмариновая кислота оказывает значительное ранозаживляющее действие; при этом активизация процессов регенерации происходит за счет более активного появления клеточных элементов в зоне рубцующейся ткани и заполнения дефекта коллагеновыми волокнами [13]. Розмариновая кислота обладает противовоспалительной [12], антиаллергенной, антивирусной активностью [3].

Целью настоящего исследования является разработка нетоксичных мягких лекарственных форм, содержащих экстракт травы *P. grandiflora* (черноголовка крупноцветковая), и апробация ранозаживляющего эффекта при термическом ожоге у экспериментальных животных.

Материалы и методы

Отбор проб растительного сырья проводили в природных популяциях *P. grandiflora* на Среднем Урале. Траву *P. grandiflora* собирали в фазу цветения в Красноуфимском районе Свердловской области к северу от д. Марийский Усть-Маш г. Мокрая (N 56°09'22.0", E 058°32'19.6") в период с 15 по 20 июля.

Сушку растений осуществляли воздушно-теневым способом. Высушенное сырьё измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 2 мм. Перед приготовлением лекарственных форм надземную часть растений *P. grandiflora* экстрагировали 96 % этанолом в течение 24 ч при комнатной температуре. Экстракт фильтровали через бумажный фильтр и высушивали на ротационном испарителе. Сухой экстракт *P. grandiflora* добавляли в заранее подготовленные составы: вазелин-ланолиновую смесь, карбопол и гидрокрем и получили три экспериментальных лекарственных формы К-1, К-2 и К-3, соответственно. В качестве контроля использовали мягкие лекарственные формы (К-4), (К-5) и нелеченую группу животных (К). Состав и процентное соотношение компонентов исследованных мягких лекарственных форм представлены в табл.

Содержание фенолкарбоновых кислот сухого экстракта *P. grandiflora* определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Анализ проб проводили в трёх повторностях. На этапе пробоподготовки экстракта брали навеску 100 мг травы черноголовки крупноцветковой и растворяли в 10 мл 96%-го этанола. ВЭЖХ проводили на оборудовании «Knauer»: насос Smartline 1000, детектор UV–VIS Smartline 2500 с использовани-

ем колонки Kromasil 100–5 C18 250x4 мм («Eka Nobel», Швеция). Использовали растворители марки «чда» производства ОАО «Реактив», Россия. Для определения фенолкарбоновых кислот, в т.ч. розмариновой кислоты, использовали элюент вода — ацетонитрил — фосфорная кислота (85:15:0.05) при скорости элюирования 0,7 мл/мин, длине волны 250 нм. Вещества идентифицировали, сравнивая t_R (время удерживания) с t_R стандартных образцов («Sigma-Aldrich», Германия). В качестве стандартных образцов использовали розмариновую кислоту ($\geq 98\%$, CAS 20283–92–5), п-кумаровую кислоту ($\geq 98\%$, CAS 501–98–4), феруловую кислоту ($\geq 98\%$, CAS 537–98–4), кофейную кислоту ($\geq 98\%$, CAS 331–39–5), сиреневую кислоту ($\geq 95\%$, CAS 530–57–5). Количество кислот рассчитывали методом абсолютной градуировки.

Экспериментальные животные содержались при температуре 20–22°C в условиях естественного и искусственного освещения на стандартном рационе питания при свободном доступе к воде и корму [9]. Доклинические исследования по ранозаживляющему действию изучаемых экспериментальных мягких лекарственных форм при термическом ожоге проводили на 60-ти белых крысах самцах популяции линий Wistar массой 195±5 г возрастом 5 мес. Экспериментальные животные были

Таблица. Состав мягких лекарственных форм
Table. Composition of soft dosage forms

Название	Наименование компонентов и их содержание, %
К-1	вазелин — 85; ланолин — 7; сухой экстракт <i>P. grandiflora</i> — 5; вода — до 100 %
К-2	карбопол — 1,50; метилпарабен — 0,25; пропилпарабен — 0,25; 10 % р-р натрия гидроксида — 2; сухой экстракт <i>P. grandiflora</i> — 5, вода — до 100 %
К-3	карбопол — 0,25; глицерин — 2; триэтаноламин — 0,3; воск эмульсионный — 3; кукурузное масло — 1; глицерилстеарат — 3; масло минеральное — 5; триглицериды каприловой и каприновой кислот — 3; циклометикон — 2; масло какао — 3; сухой экстракт <i>P. grandiflora</i> — 5; вода — до 100 %
К-4	карбопол — 1,50; метилпарабен — 0,25; пропилпарабен — 0,25; 10 % р-р натрия гидроксида — 2; вода — до 100 %
К-5	карбопол — 0,25; глицерин — 2; триэтаноламин — 0,3; воск эмульсионный — 3; кукурузное масло — 1; глицерилстеарат — 3; масло минеральное — 5; триглицериды каприловой и каприновой кислот — 3; циклометикон — 2; масло какао — 3; вода — до 100 %

распределены на шесть групп по десять особей в каждой. Модель термического ожога крысам, находящимся под эфирным наркозом, создавали металлическим шпателем (площадью 6х2 см, т.е. 12 см²), разогретым до температуры 98–100°C. Время контакта шпателя с выстриженным от шерсти участком кожи животного — 40 с [4]. Данный ожог соответствует II–IIIa степени тяжести. Через сутки после ожога крысам опытных групп наносили на пораженные участки кожи К-1, К-2 и К-3 и контроль К-4 и К-5. Контрольная группа (К) лечения не получала. Эти исследуемые мягкие лекарственные формы наносили на ожоговую поверхность ежедневно (в утренние часы) в течение 21-го дня в дозе 200 мг (512,82 мг/кг), равномерно распределяя их стеклянной палочкой по всей ожоговой поверхности. Эта доза была определена в соответствии её безвредности для экспериментального животного при длительном применении. Согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [9], если вещество не вызывает токсического проявления на лабораторном животном в дозе более 2000 мг/кг, то оно считается безопасным. В скрининговых исследованиях на мышах нам не удалось определить LD₅₀ изучаемого экстракта при местном нанесении, поэтому из трёх рекомендуемых доз (1/100, 1/50 и 1/10 от максимальной дозы — 2000 мг/кг) мы избрали максимальную дозу 512,82 мг/кг в мягкой лекарственной форме, т.е. 200 мг на особь массой 195±5,0 г [6].

Статистическую обработку проводили с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel и Statistica 6.0. При сравнении и анализе выборок использовали непараметрический критерий с достоверностью $p < 0,05$ (U-критерий Манна–Уитни), методы описательной статистики в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки.

Результаты и их обсуждение

Приготовленный сухой концентрированный экстракт *P. grandiflora* представляет собой порошок темного зеленоватого цвета без запаха. В сухом экстракте *P. grandiflora* содержится розмариновая (621±5,0 мг/г), кофейная (11,2±0,2 мг/г), сиреневая (46,5±1,4 мг/г), п-кумаровая (25,8±0,5 мг/г), феруловая (42,7±2,9 мг/г) кислоты (рис. 1).

В экспериментальных лекарственных формах К-1, К-2 и К-3 содержание розмариновой кислоты снизилось и составило 155±5,0 мг в каждой лекарственной форме. На основании представленных составов мягких лекарственных форм, содержащих БАВ, предположили их возможное ранозаживляющее действие при термических ожогах.

Исследуя фармакологическое ранозаживляющее действие трех экспериментальных мягких лекарственных форм с экстрактом *P. grandiflora* и основ карбопола, гидрокрема, проводили сравнительную оценку заживления ожоговых ран у экспериментальных животных (рис. 2).

Отмечали скорость прохождения этапов эпителизации ожоговых ран: образование корочки, нарушение целостности корочки, отторжение корочки, восстановление эпителия и покрытие шерстью. Корочка у всех групп сформировалась на 3–4 сут. после получения термического ожога. Восстановление эпителия и покрытие шерстью в группах крыс, леченных К-1–К-3, происходит раньше, чем в группах, леченных основами без экстракта, на 6–8 дней (рис. 2). Стандартная ошибка среднего не превышает 9%. По критерию Манна–Уитни были получены значимые различия ($p < 0,05$) у опытных групп, получавших лечение мягкими лекарственными формами К-1–К-5, в сравнении с контролем (К) на стадии нарушения целостности корочки и отторжения корочки. По времени наступления стадий образование корочки, восстановление эпителия и покрытие шерстью

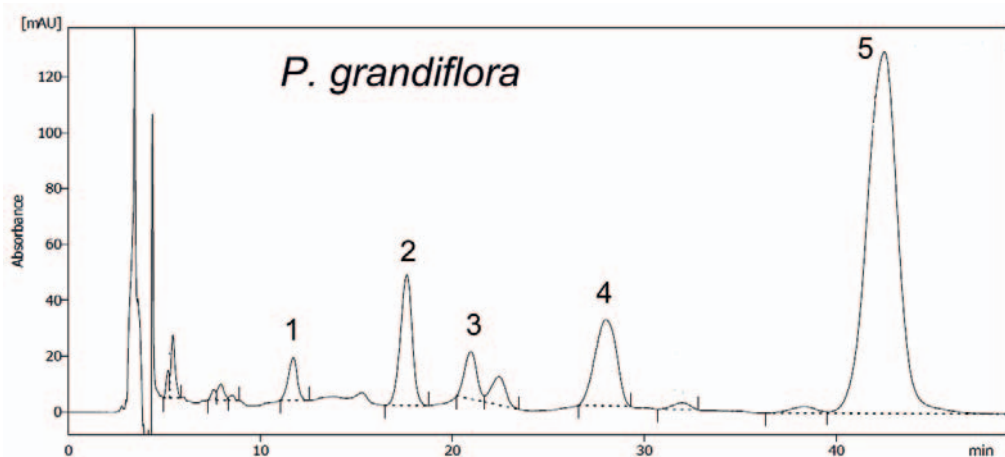


Рис. 1. Хроматограмма сухого экстракта надземной части *P. grandiflora*.

По оси абсцисс — время удерживания, t_R , мин; по оси ординат — оптическая плотность, е. о.п.; 1 — кофейная, 2 — сиреневая, 3 — *p*-кумаровая, 4 — феруловая, 5 — розмариновая кислоты.

Fig. 1. Chromatogram of dry extract of the aerial part of *P. grandiflora*.

The abscissa axis shows the retention time, t_R , min; ordinate axis — optical density, o.d.u.; 1 — coffeic, 2 — syringic, 3 — *p*-coumaric, 4 — ferulic, 5 — rosmarinic acids.

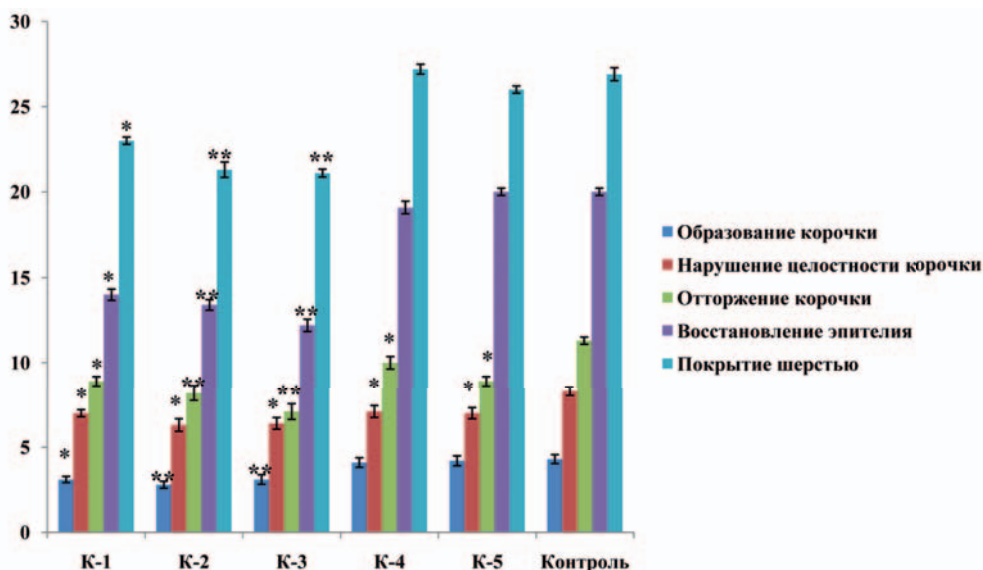


Рис. 2. Эпителизация ожоговых ран на фоне исследуемых мягких лекарственных форм у крыс (в днях).

Примечание: статистические показатели: среднее±стандартная ошибка; * — значения, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей в контрольной (нелеченой) группе, при $p < 0,05$ (критерий Манна—Уитни); ** — значения, достоверно отличающиеся от соответствующих показателей в контрольных (нелеченой и леченных основами, без экстракта) группах, при $p < 0,05$ (критерий Манна—Уитни).

Fig. 2. Epithelialization of burn wounds in view of the studied soft dosage forms for rats (in days).

Note: statistical indicators: mean±standard error; * — values that significantly differ from the corresponding indicators in the control (untreated) group at $p < 0.05$ (Mann—Whitney test); ** — values that significantly differ from the corresponding indicators in the control (untreated and treated with bases, without extract) groups at $p < 0.05$ (Mann—Whitney test).

между группами крыс, леченными основными (К-4 и К-5), и контролем (К) не обнаружено достоверных отличий.

Таким образом, при применении мягких лекарственных форм с экстрактом *P. grandiflora* отмечены достоверные различия на каждой стадии эпителизации ожоговых ран у групп крыс в сравнении с контролем (нелеченой группой крыс). А также образование корочки, восстановление эпителия и покрытие шерстью в этих группах происходит достоверно быстрее, чем в группах крыс, леченных основными без экстракта (рис. 2).

При применении ланолина и вазелина (с экстрактом *P. grandiflora*) сроки эпителизации ран у крыс несколько замедляются по сравнению с группами, леченными

К-2 и К-3, на 1–2 дня. Влияние основы на проводимость действующих веществ показывают и литературные данные [5]. При использовании карбопола и гидрокрема с экстрактом *P. grandiflora* не отмечено отличий по времени эпителизации ран у экспериментальных животных.

Выводы

В эксперименте на лабораторных животных установлено, что три (К-1, К-2 и К-3) экспериментальные мягкие лекарственные формы, содержащие сухой экстракт *P. grandiflora*, обладают противовоспалительным и ранозаживляющим эффектом при термическом ожоге с сокращением срока заживления ран у крыс в среднем на 6–8 сут. по сравнению с контролем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Ажикова А.К., Лазыко М.В., Ажиков А.С. Терапевтический эффект использования кедрового масла при ожоговой травме. *Естественные науки*. 2008;4(25):75–77. [Azhikova A.K., Lazko M.V., Azhikov A.S. Terapevticheskij e'ffekt ispol'zovaniya kedrovogo masla pri ozhogovoj travme [The therapeutic effect of using cedar nut oil for burn injury]. *Estestvenny'e nauki* [Natural Sciences]. 2008;4(25):75–77. (In Russian)].
2. Алексеева Л.И., Болотник Е.В. Розмариновая кислота и антиоксидантная активность *Prunella grandiflora* и *Prunella vulgaris* (Lamiaceae). *Растительный мир Азиатской России*. 2013;11(1):121–125. [Aleksееva L.I., Bolotnik E.V. Rozmarinovaya kislota i antioksidantnaya aktivnost' *Prunella grandiflora* i *Prunella vulgaris* (Lamiaceae) [Rosmarinic acid and antioxidant activity of *Prunella grandiflora* and *Prunella vulgaris* (Lamiaceae)]. *Rastitel'ny'j mir Aziatskoj Rossii* [The flora of Asian Russia]. 2013;11(1):121–125. (In Russian)].
3. Буданцев А.А., Лесиовская Е.Е. Розмариновая кислота: источники и биологическая активность. *Растительные ресурсы*. 2012;48(3):453–468. [Budantsev A.A., Lesiovskaya E.E. Rozmarinovaya kislota: istochniki i biologicheskaya aktivnost [Rosemarinic acid: sources and biological activity]. *Rastitel'ny'e resursy* [Растительные ресурсы]. 2012;48(3):453–468. (In Russian)].
4. Волков А.А., Ларионов Л.П., Забокрицкий Н.А., Хонина Т.Г., Тосова И.Н., Федотова Е.В., Мишечкина А.А., Кочеткова В.Е., Тарасова Е.В. Разработка и доклиническое изучение инновационных композиций мягкой лекарственной формы на основе диметилдиглицероксисилана при термической травме. *Биомедицина*. 2010;5:71–73. [Volkov A.A., Larionov L.P., Zabokriczkij N.A., Xonina T.G., Tosova I.N., Fedotova E.V., Mishechkina A.A., Kochetkova V.E., Tarasova E.V. Razrabotka i doklinicheskoe izuchenie innovacionny'x kompozicij myagkoj lekarstvennoj formy' na osnove dimetildigliceroksisilana pri termicheskoj travme [Development and preclinical study of innovative compositions of soft dosage form based on dimethyldiglyceroxysilane for thermal injury]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2010;5:71–73. (In Russian)].
5. Гаврилов А.С. *Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных препаратов*. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010:624. [Gavrilov A.S. *Farmaceuticheskaya texnologiya. Izgotovlenie lekarstvenny'x preparatov* [Pharmaceutical technology. Manufacturing of medicines]. Moscow: GE'OTAR-Media Publ., 2010:624. (In Russian)].
6. Гуськова Т.А. *Токсикология лекарственных средств*. М.: Русский врач. 2003:76. [Guskova T.A. *Toksikologiya lekarstvenny'x sredstv* [Drug toxicology]. Moscow: Russkij vrach Publ., 2003:76. (In Russian)].
7. Курчатова М.Н., Дурнова Н.А. Влияние растительных экстрактов на индукцию микроядер циклофосфаном в эритроцитах крови беспородных белых мышей. *Цитология*. 2015;57(6):452–458. [Kurchatova M.N., Durnova N.A. Vliyanie rastitel'ny'kh ekstraktov na indukciu mikroyader ciklofosfanom v eritrocitax krvi besporodnykh belyx myshej. *Citologiya*. 2015;57(6):452–458.

- tel'ny'h e'kstraktov na indukciyu mikroyader ciklofosfanom v e'ritrocitax krovi besporodny'x bely'x my'shej [Influence of plant extracts on the induction of micronuclei by cyclophosphamide in erythrocytes of blood of outbred white mice]. *Cytology*. 2015;57(6):452–458. (In Russian)].
8. Лесяковская Е.Е. *Доказательная фитотерапия*. М: Ремедиум, 2014:224. [Lesiovskaya E.E. *Dokazatel'naya fitoterapiya* [Evidence-based herbal medicine]. Moscow: Remedium Publ., 2014:224. (In Russian)].
9. Хабриев Р.У. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина, 2013:942. [Khabriev R.U. *Rukovodstvo po e'ksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novy'h farmakologicheskikh veshchestv* [Guidelines for experimental (pre-clinical) study of new pharmacological substances]. Moscow: Meditsina Publ., 2013:942. (In Russian)].
10. Чмырев И.В., Бутрин Я.Л. Консервативное лечение ожогов лица. *Медицинский вестник Юга России*. 2020;11(2):129–133. [Chmyrev I.V., Butrin Ya.L. Konservativnoe lechenie ozhogov lica [Conservative treatment of facial burns]. *Medicinskij vestnik Yuga Rossii* [Medical Bulletin of the South of Russia]. 2020;11(2):129–133. (In Russian)].
11. Шамилов А.А. Растения рода *Prunella*: химический состав, виды фармакологического действия. *Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация*. 2017;4:152–160. [Shamilov A.A. Rasteniya roda *Prunella*: himicheskij sostav, vidy' farmakologicheskogo dejstviya [Plants of the *Prunella* genus: chemical composition, types of pharmacological action]. *Voronezh State University Bulletin, Series: Chemistry, Biology, Pharmacy*. 2017;4:152–160. (In Russian)].
12. Qiang Z., Ye Z., Hauck C., Murphy P.A., McCoy J.-A., Widrlechner M.P., Reddy M., Hendrich S. Permeability of rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and ursolic acid in *Salvia officinalis* extract across Caco — 2 cell monolayers. *J. of Etno pharmacology*. 2011;137:1107–1112.
13. Oh C.S., Price J., Brindley M.A., Widrlechner M.P., Qu L., McCoy J.-A., Murphy P., Hauck C., Maury W. Inhibition of HIV-1 infection by aqueous extracts of *Prunella vulgaris* L. *Virology J*. 2011;8:188–197.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Болотник Елизавета Витальевна*, к.б.н.,
ФГБУН «Ботанический сад» Уральского отделения РАН;
e-mail: LizaVB@yandex.ru

Алексеева Людмила Ивановна, к.х.н., ФГБУН
«Ботанический сад» Уральского отделения РАН;
e-mail: alexeeva@ib.komisc.ru

Ларионов Леонид Петрович, д.м.н., проф.,
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России;
e-mail: leonid-larionov@mail.ru

Elizaveta V. Bolotnik*, Cand. Sci. (Biol.),
Botanical Garden of the Ural Branch of RAS;
e-mail: LizaVB@yandex.ru

Lyudmila I. Alekseeva, Cand. Sci. (Chem.),
Botanical Garden of the Ural Branch of RAS;
e-mail: alexeeva@ib.komisc.ru

Leonid P. Larionov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Ural
State Medical University;
e-mail: leonid-larionov@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author