

А. М. Попов<sup>1</sup>, И. А. Лу<sup>1</sup>, Д.-И. Канг<sup>2</sup>

## АНАЛЬГЕЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА “CF”, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ СЕМЯН САФЛОРА КРАСИЛЬНОГО *Carthamus tinctorius* L., И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ

<sup>1</sup> Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток, Россия,  
e-mail: popovam@piboc.dvo.ru;

<sup>2</sup> Корейский институт гербальной акупунктуры, Сеул, Республика Корея, e-mail:kiha@kiha.co.kr

Изучены анальгезирующие свойства масляного препарата “CF” из семян сафлора красильного *Carthamus tinctorius* L. Локальный анестетик лидокаин и трициклический антидепрессант амитриптилин, которые вызывают полную блокаду седалищного нерва, были использованы в качестве положительного контроля. Показано, что действие CF сопровождается существенным уменьшением ноцицептивной и проприоцептивной функции седалищного нерва мышей. Дозы 0,1 мл указанного препарата достаточно, чтобы вызвать частичную локальную анестезию задней конечности, иннервируемой седалищным нервом, не вызывая токсических побочных эффектов. Таким образом, препарат CF представляет собой природный локальный анестетик, который проявляет умеренную обезболивающую активность путем влияния на серотонинергические и моноаминергические пути. Препарат CF может занять одно из ведущих мест среди локальных анестетиков, используемых в традиционной медицине, в частности фармако- и акупунктуре, а также медицинском массаже.

**Ключевые слова:** препарат “CF” из семян *Carthamus tinctorius* L, анальгезирующие свойства

В лечебной практике существует проблема недостатка широкого ассортимента обезболивающих и местно анестезирующих средств, не обладающих наркотическими свойствами. Указанная проблема вынуждает применять различные анальгезирующие препараты, способные избирательно ослабить или устранить ощущение боли, и делает актуальным поиск новых эффективных анестезирующих средств, обладающих минимальными побочными эффектами [1 – 3].

Обезболивающие средства, применяемые в клинической практике, на разных уровнях воздействуют на ноцицептивный канал. Один из перспективных путей борьбы с болью — разработка способов активации функции антиноцицептивной системы, основным нейротрансмиттером которой является серотонин.

Масляный препарат CF, полученный путем прессования из семян растения *Carthami-Tinctorii fructus* (семейство Asteraceae), обладает умеренной анальгезирующей активностью и используется многие годы в Корейской гербальной акупунктуре. Этот препарат состоит из полиненасыщенных жирных кислот, включая смесь  $\alpha$ -линолевой (более 70 %), олеиновой и других кислот, а также серотонин и его конъюгаты, полифенольные и другие соединения [4].

Основным показанием к лечебному применению препарата CF является характерная для него обезболивающая активность. Однако особенности обезболивающей активности и механизма действия компонентов, входящих в состав CF, до настоящего времени не были изучены.

В настоящей работе изучены содержание серотонина в препарате CF и его анальгезирующие свойства на

модели функциональной блокады седалищного нерва мышей. В качестве положительного контроля использованы широко известные местный анестетик лидокаин и трициклический антидепрессант (ТЦА) амитриптилин, вызывающие полную блокаду седалищного нерва экспериментальных животных.

### Экспериментальная часть

Препарат CF представляет собой масло светло-желтого цвета без запаха, полученное в результате прессования семян однолетнего лекарственного растения *Carthami Tinctorii* L. (сем. сложноцветные). Препарат CF был предоставлен Корейской ассоциацией гербальной акупунктуры для испытаний в готовом виде.

Для экстракции серотонина из препарата CF к 0,5 мл исследуемого образца добавляли 200 мкл пропанола, перемешивали на смесителе “Вортекс” в течение 1 мин. Затем добавляли 500 мкл 0,2 н. раствора  $\text{HClO}_4$ , повторно интенсивно перемешивали на смесителе до образования однородной эмульсии. Полученную эмульсию центрифугировали при 1500 об./мин на центрифуге K-70D (Германия), и водную фракцию отбирали для дальнейших исследований.

Концентрацию серотонина в водной фракции определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с применением электрохимического детектора. Количественное определение серотонина проводили на хроматографе “Bioanalytical Systems Inc.” (BAS), оснащенный изократической помпой “PM-80”, электрохимическим детектором LC-4B со стеклоуглеродным электродом и соответствующим

программным обеспечением для регистрации и обесчета хроматограмм МУЛЬТИХРОМ (Амперсенд). Условия хроматографирования: подвижная фаза — 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0,3 мМ натрия октансульфоната, 0,1 мМ ЭДТА и 9 % ацетонитрил; скорость подвижной фазы — 1,4 мл/мин; детектирование — стеклоглеродный электрод с потенциалом +850 мВ против Ag/AgCl электрода сравнения; колонка Phenomenex Synergi Max RP-18 (4,0 × 150 мм, 4 мкм). Время удерживания серотонина в этих условиях составило 7,45 мин.

Для построения калибровочной кривой к 0,5 мл исследуемого образца добавляли 200 мкл пропанола с 50, 100, 150 и 250 пикомоль серотонина, что соответствует 0,1, 0,2, 0,3 и 0,5 моль серотонина на 1 мл образца, после чего проводили экстракцию. Все эксперименты проводили в 3 повторах.

Для функциональной оценки блокады седалищного нерва использовали линейных мышей СВА массой  $20 \pm 2$  г, которые были выращены в виварии Тихоокеанского института биоорганической химии (ТИБОХ) ДВО РАН (Владивосток). Животных содержали на стандартной диете в соответствии с действующими нормами. Кормление производили в фиксированное время. Эксперименты проводили на животных обоего пола, учитывая полученные данные отдельно для самок и самцов. Экспериментальные животные содержались в условиях нормальной влажности (до 70 %) и температуры (22 – 24 °С), а также с соблюдением 12 ч чередования цикла света и темноты. Животных за 7 дней перед экспериментом отсаживали в отдельные клетки (не более 5 мышей на клетку) и подготавливали к нему. Фармакологические исследования на мышах проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

Препарат CF вводили в седалищный вырез в объеме 100 – 200 мкл туберкулиновым шприцом вдоль левой задней ноги (иглу ориентировали от седалищного бугра по линии большой бедренной кости). При проведении функциональных испытаний правая задняя нога служила в качестве контроля. Для однотипности введений их производил 1 опытный экспериментатор. Оценку ноцицептивных и проприоцептивных реакций проводили в соответствии с методическими рекомендациями [5], которые были использованы этими авторами при изучении функциональной блокады седалищного нерва лидокаином.

Болевую функцию оценивали путем наблюдения за реакцией отдергивания конечности на сильное раздражение. После введения исследуемых препаратов оценку анальгезирующего эффекта проводили путем измерения латентного времени отдергивания в секундах при воздействии теплового раздражения путем погружении задней конечности в циркулирующую горячую воду при 51 °С. Промежуток времени между тепловым воздействием на контрольную и опытную конечности составлял не менее 1 мин. Моторную функцию

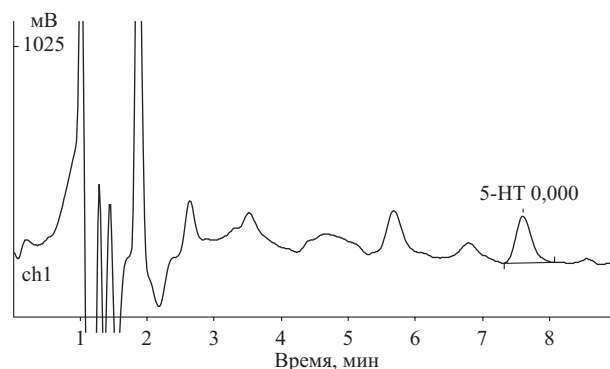


Рис. 1. Хроматограмма образца препарата CF без добавления серотонина при чувствительности детектора 5 нА: Ch1 — холестерин; 5-НТ — серотонин (5-гидрокситриптамин).

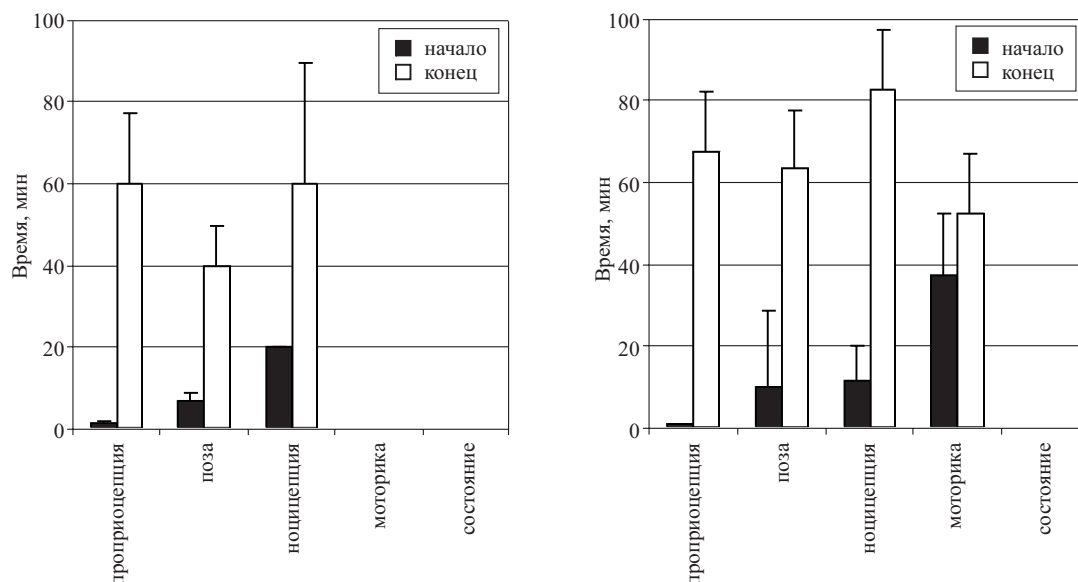
определяли путем измерения толчков силы разгибательной мышцы, действующей на цифровые платформенные весы. Проприоцептивную функцию оценивали по реакции на тактильное размещение конечности на металлическую сетку. Нарушение проприоцептивной функции отмечали в случае неточного помещения лапки на прутья сетки, расстояние между которыми составляло около 1 см. Оценка проприоцепции основывалась также на анализе позы покоя и позовых реакций.

Оценку неврологического статуса всегда производили в следующей последовательности: 1 — проприоцепция, 2 — поза, 3 — ноцицепция, 4 — моторная функция и 5 — психическое состояние. При определении функционального дефицита нижних конечностей животных разделяли на категории: норма, умеренное уменьшение и полная блокада. При оценке общего психического состояния животных во все время блокирования нерва учитывались их подвижность, тревожность и реакция на слабые внешние раздражения.

Все величины выражали как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значимость различий между началом и окончанием блокирования различных функций оценивали с помощью непараметрического теста Фишера. Величина вероятности  $p < 0,05$  рассматривалась как значимая. Статистические расчеты проводили по программе Microsoft Excel, 6.0 (Redmond WA).

### Результаты и их обсуждение

Оценку концентрации серотонина в исследуемых и стандартных образцах проводили по соотношению площадей пиков серотонина на хроматограммах. На основании данных стандартных образцов рассчитывали содержание серотонина в образцах препарата CF. Типичная хроматограмма экстракта из масляного образца препарата CF без добавления внешнего серотонина приведена на рис.1. Как показывает расчет, проведенный на основании анализа 3 образцов, средняя концентрация серотонина в препарате CF составляет  $0,109 \pm 0,005$  нмоль/мл.



**Рис. 2.** Время начала частичной блокады и полного восстановления функций седалищного нерва при действии разных концентраций препарата CF ( $n = 20$ ). Доза CF: а – 0,1 мл; б – 0,2 мл.

Количественная оценка времени начала, окончания и интенсивности различных функциональных нарушений или блокирования седалищного нерва экспериментальных животных дает возможность установить дозы и условия, которые приводят к различной нервной блокаде и позволяет сравнивать эти изменения с известными анестетиками [6].

Как видно из рис. 2, введение препарата CF в дозах 0,1 – 0,2 мкл в область прохождения седалищного нерва у мышей не вызывало негативного воздействия на общее состояние опытных животных и раздражения кожи в месте инъекции. Однако через 10 – 15 мин после введения CF в дозе 100 мкл у животных наблюдали резкое снижение ноцицептивной и проприоцептивной (“эффект проваливания ноги”) функций. Состояние животных полностью нормализовалось в течение последующих 30 – 40 мин. В дозе 0,2 мл препарат CF усиливал частичную блокаду болевой, моторной и проприоцептивной функции, а возвращение в нормальное состояние начиналось через 0,8 – 1 ч после его инъекции. При этом психический статус (подвижность животных и реакция на слабые внешние раздражения) оставался в норме, т.е. таким же, как и у интактных животных.

Количественная оценка начала и окончания различных функциональных изменений седалищного нерва при введении препарата CF позволила сравнить эти изменения с ТЦА амитриптилином и локальным анестетиком лидокаином (рис. 3).

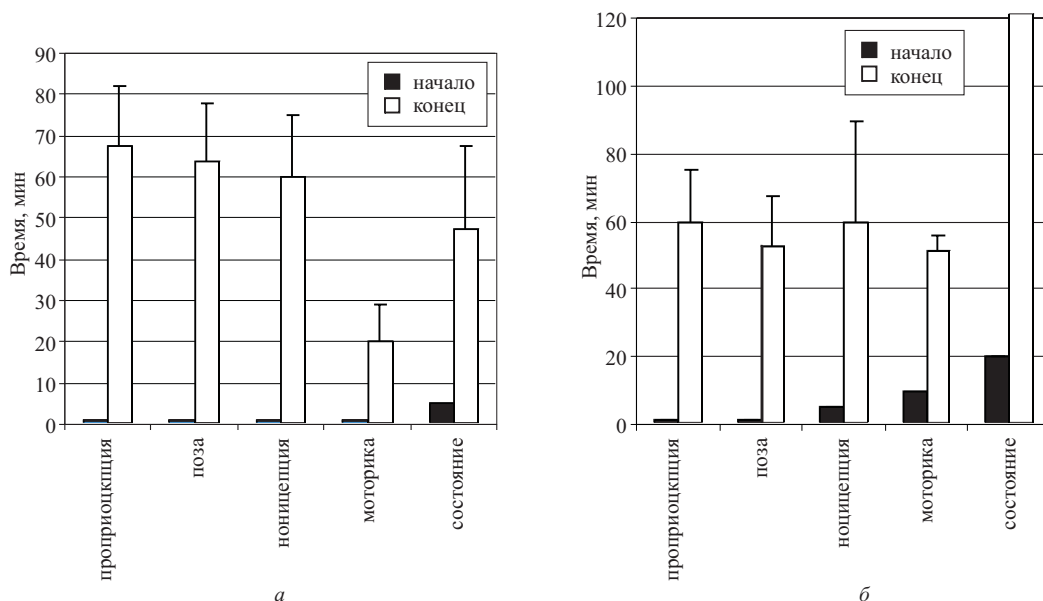
Введение 0,1 мл 1 % раствора лидокаина вызывало полное блокирование проприоцептивной, ноцицептивной и моторной функций в течение первой минуты после введения. По сравнению с другими препаратами лидокаин обладал наибольшим анальгезирующим действием и вызывал полное блокирование функций (с 5 по 20 мин после воздействия). При этом лидокаин оказывал существенное влияние на общее состояние

животных, частично подавляя подвижность и ослабляя реакцию на слабые внешние раздражения (рис. 3, а).

Амитриптилин обладал менее выраженными, чем у лидокаина, анальгезирующими свойствами. Через 30 мин после введения этот ТЦА оказывал системное действие на организм, в частности, у животных наблюдалось резкое снижение активности, вялость и замедление рефлекторных реакций, в том числе на температурное воздействие. Восстановление до нормального состояния происходило только через 3–4 ч после введения 0,1 мл 5 мМ раствора амитриптилина (рис. 3, в).

Таким образом, можно сделать заключение, что препарат CF в дозах 100 – 200 мкл обладает умеренной анальгезирующей активностью, оказывает влияние на проприоцептивные и моторные функции. Продолжительность обезболивающего действия CF в указанных выше дозах сравнима с оптимальными действующими концентрациями местного анестетика лидокаина и ТСА амитриптилина. Однако данный природный анестетик оказывает значительно меньшее влияние на моторную функцию. Следует отметить, что в отличие от лидокаина и амитриптилина CF не влияет на общее психическое состояние организма экспериментальных животных (см. рис. 2 и 3) и не проявляет побочных токсических эффектов.

По нашему мнению, имеются определенные черты сходства в характере блокирующего действия нервных функций между ТЦА амитриптилином и CF. Отмеченное нами сходство может быть связано с тем, что в состав препарата CF входит серотонин, накопление которого в синаптической щели наблюдается при действии на серотонинэргические пути ТЦА. ТЦА ингибируют действие в синаптической щели белкового транспортера серотонина, осуществляющего его обратный захват в нейрон и, как следствие этого, его дезактивацию. Избыточное накопление серотонина приводит к



**Рис. 3.** Время начала блокады и полного восстановления функций седалищного нерва при действии: (а) – 0,1 мл 1% раствора лидокаина ( $n = 5$ ); (б) – 0,1 мл 5 мМ раствора amitриптилина ( $n = 5$ ).

повышению функциональной активности серотонин-эргической антиноцицептивной системы и частично или полному блокированию нейромышечной передачи [2, 3].

Введение CF в область расположения седалищного нерва, очевидно, также приводит к локальному увеличению содержания серотонина в синаптической области седалищного нерва, что и приводит к частичной блокаде его функциональной активности. Однако в отличие от ТЦА CF в исследованных дозах не обладает нейротоксической активностью.

Кроме того, анальгетический эффект препарата CF может быть также объяснен высокой антиоксидантной активностью и сильным ингибирующим действием на активность тиразины серотониновых конъюгатов — N-ферулоилсеротонина и N-(*p*-кумароил)серотонина, которые входят в состав препарата CF [7]. Моноаминергические нейротрансмиттеры выступают как субстраты фермента тиразины, которая распространена во всех животных организмах, относится к классу оксидаз и может принимать участие в трансформации и инактивации серотонина. Следовательно, ингибирующее действие в отношении тиразины серотониновых конъюгатов в составе препарата CF, может оказывать косвенное влияние на повышение содержания серотонина в синаптической щели и, тем самым, оказывать влияние на функциональную активность седалищного нерва.

Следует отметить также, что масляную основу препарата CF составляет ненасыщенная (C18:2) линолевая кислота (более 70 %). Линолевая кислота ускоряет протеолитическую деграцию тиразины и тем самым может опосредованно ингибировать синтез моноаминергических нейротрансмиттеров, которые проводят болевой сигнал [8].

Препарат CF может применяться в качестве локального местно анестезирующего средства при проведении курса фармакопунктуры для купирования болевых синдромов разной этиологии. Фармакопунктура, т.е. методика введения лекарственных веществ в акупунктурные точки (АТ), широко применяется в восточной медицине. В литературе отражены результаты многочисленных электрофизиологических исследований, проведенных в разных странах, которые доказывают объективность существования АТ [9]. Для инъекций используются очень малые дозы, так как лекарства адресно поступают прямо в АТ, отчего эффективность их лечебного действия многократно возрастает. В сравнении с внутримышечными инъекциями фармакопунктура не только более эффективна, но и позволяет значительно снизить лекарственную нагрузку на организм пациента и практически исключить побочные эффекты. Одним из основных достоинств фармакопунктуры является возможность быстро избавить пациента от боли.

Результаты многолетнего использования данного препарата как средства корейской гербальной акупунктуры не выявили каких-либо серьезных побочных эффектов. Препарат CF недорог, доступен и имеет широкую перспективу для использования в фармако- и акупунктуре, а также при лечебном массаже.

## ЛИТЕРАТУРА

1. S. H. Sindrup and T. S. Jensen, *Pain*, **83**(3), 389 – 400 (1999).
2. Y. Sudoh, E. E. Cahoon, P. Gerner, et al., *Pain*, **103**(1–2), 49 – 55 (2003).
3. J. P. Estebe and R. R. Myers, *Anesthesiology*, **100**(6), 1519 – 1525 (2004).
4. A. M. Popov, I. A. Lee, and D.-I. Kang, *The 1st Int. Symp. of Acupuncture and Meridian Studies (SAMS)*, Seoul (2005), pp. 23 – 24.
5. J. G. Thalhammer, M. Vladimirova, B. Bershatsky, et al., *Anesthesiology*, **82**(4), 1013–1025 (1995).

6. S. A. Raymond and A. J. Gissen, in: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. **81**, G. R. Strichartz (eds.), Springer-Verlag, Heidelberg (1987), pp. 95 – 164.
7. J. S. Roh, J. Y. Han, J. H. Kim, et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**(12), 1976 – 1978 (2004).
8. H. Ando, Y. Funasaka, M. Oka, et al., *J. Lipid Res.*, **40**(7), 1312 – 1316 (1999).
9. Д. М. Табеева, *Практическое руководство по акупунктуре*, Медпресс-инфо, Москва (2004), сс. 221 – 235.

Поступила 04.02.06

## **ANALGESIC PROPERTIES OF THE CF PREPARATION FROM SAFFLOWER (*Carthamus tinctorius*) SEEDS AND THE PROSPECTS FOR ITS USE IN MEDICINE**

A. M. Popov<sup>1\*</sup>, I. A. Lee<sup>2</sup>, and D.-I. Kang<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far-East Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia;

<sup>2</sup> Korean Institute for Herbal Acupuncture, Seoul, Korea

\*e-mail: popov@piboc.dvo.ru

Analgesic properties of the CF oil preparation from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds have been studied. Local anesthetic lidocaine and tricyclic antidepressant amitriptyline, which induce complete sciatic nerve blockade, were used as the positive control. It is established that the administration of CF is accompanied by a substantial decrease in the nociceptive and proprioceptive functions of the sciatic nerve in mice. CF dose of 0.1 ml is sufficient to produce a partial local anesthesia of the hind limb, which is innervated by the sciatic nerve. At the same time, CF does not cause any toxic side effects. Thus, CF preparation is a natural local anesthetic, which produces a moderate antinociceptive effect, probably due to its influence on the serotonergic and monoaminergic pathways. CF preparation can occupy a leading position among local anesthetics used in the traditional medicine, particularly in pharmaco- and acupuncture, as well as in therapeutic massage.

**Keywords:** CF preparation from safflower, analgesic properties