

**О. І. Александрова, О. О. Нефьодов, А. О. Цісак, Л. В. Еберле,
І. М. Радаєва, О. В. Устянська, О. І. Грицук**

Розробка мазі на основі екстрактів з листя та зелених плодів *Juglans regia L.* з протизапальною й аналгетичною дією

*Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
м. Одеса*

*Ключові слова: екстракт, горіх волоський
(*Juglans regia L.*), поліфеноли,
флавоноїди, мазь, протизапальна дія,
аналгетична дія*

Одна з найбільших проблем медицини пов'язана із запальними процесами та больовими синдромами різного генезу, що супроводжують багато різних захворювань. Запалення є складним процесом, який виник у ході еволюції як захисна реакція живої тканини на місцеве пошкодження або інвазію сторонніх факторів (токсинів, патогенів), що зазвичай супроводжується почервонінням, болем, жаром, набряком і втраченою функцією у пошкодженій ділянці [1]. Ключове значення для організму має саме тривалість і ступінь запальної реакції, на що спрямоване використання протизапальних препаратів синтетичного та рослинного походження [2]. Використання лікарських рослин традиційно вважається безпечним, недорогим і розповсюдженим методом лікування [3]. У сучасній медицині велика увага приділяється рослинним лікарським засобам як місцевої, так і системної дії завдяки наявності біологічно активних речовин з широким спектром фармакологічної активності, що дозволяє отримати комплексну дію фітозасобів [4–7].

Juglans regia L. є цінною лікарською рослиною, яка розповсюджена на території України [8] та має значний лікувальний потенціал для

терапії широкого спектра захворювань. З давніх часів широко відомі поживна цінність плоду та цілющі властивості майже всіх частин цієї рослини, такі як антибактеріальна, протизапальна, ранозагоювальна, протигрибкова, цуркознижувальна, антиоксидантна, кровоспинна дія та інші [9–13]. За багатьма дослідженнями, така дія зумовлена, перш за все, вмістом вторинних метаболітів рослини: фенольних сполук, терпеноїдів, алкалоїдів, глікозидів та інших [14, 15].

Мета дослідження – визначення оптимальних умов екстракції біологічно активних речовин з листя та зеленого плоду *Juglans regia L.* для подальшого використання екстрактів у складі мазі з протизапальною та аналгетичною дією.

Матеріали та методи. Для отримання екстрактів використовували свіжі попередньо подрібнені листя, шкірку та ядра зелених плодів *Juglans regia L.* Як екстрагент використовували 70 % етанол, співвідношення сировини до екстрагента складало 1 до 20. Одна група екстрактів була отримана методом мацерації впродовж 10 діб, іншу групу екстрактів до проведення мацерації піддавали кип'ятінню зі зворотним холодильником протягом 30 хв.

Вміст суми поліфенольних сполук в екстрактах визначали спектрофотометричним методом з використанням

реактиву Фоліна-Чокольтеу в перерахунку на галову кислоту [16, 17]. Спектрофотометричне визначення проводили на спектрофотометрі UV-2401PC (Shimadzu) за довжини хвилі 765 нм і товщини поглинаючого шару 10 мм.

Загальний вміст флавоноїдів в екстрактах у перерахунку на рутин також визначали спектрофотометричним методом з використанням реактиву $AlCl_3$ [18]. Оптичну густину відповідних розчинів вимірювали за довжини хвилі 405 нм і товщини поглинаючого шару 10 мм.

Визначення антиоксидантної (антирадикальної) активності екстрактів проводили за стандартним методом, який базується на взаємодії біологічно активних речовин екстрактів із стабільним хромоген-радикалом 2,2-дифеніл-1-пікрілгідразилом (DPPH) (Sigma) [19, 20]. Як реагент використовували 0,15 ммоль/л DPPH у 70 % етанолі, який додавали до аліквоти відповідних екстрактів і вимірювали оптичну густину розчинів (за довжини хвилі 517 нм з поглинаючим шаром 10 мм) через 30 хв, тримаючи розчини в темному місці. Антиоксидантну активність екстрактів розраховували як ступінь інактивації розчину DPPH (%):

$$\text{Активність (\%)} = \frac{A_K - A_{EK}}{A_K} \cdot 100$$

де A_K – оптична густина контрольного розчину DPPH без додавання екстрактів, A_{EK} – оптична густина розчину DPPH через 30 хв після додавання досліджуваних екстрактів.

Усі спектрофотометричні дослідження проводились у трьох паралелях з наступним розрахунком середньоарифметичного значення (M) та стандартного відхилення (m) за допомогою стандартного пакета комп'ютерних програм MS Excell.

Для отримання мазі відповідні екстракти випаровували на роторному випарювачі за підвищеного тиску та температури 50 °С, отриманий густий екстракт додавали до дифільної мазевої основи, яка містила суміш поліетиленгліколю (ПЕГ 1500), поліетиленоксиду (ПЕО 400) та 1,2 пропіленгліколю (ПГ) за масовим співвідношенням 4 : 2 : 3. Як референтний препарат був обраний ібупрофен, який вводили до мазевої основи для отримання 4 % мазі (Ібупрофен, чда, Rensin Chemicals Limited, China).

Протизапальну дію екстрактів у складі мазі визначали на моделі карагенін-індукованого запалення. У дослідах використовували білих лабораторних щурів масою (190 ± 10) г, по 5 тварин у кожній групі. Гостру запальну реакцію викликали субплантарним введенням карагеніну (0,2 мл 0,2 % водного розчину). Тварин розподіляли на три групи: перша група – тварини, яким вводили в кінцівку розчин карагеніну та лікування не проводили (контроль запалення); друга група – тварини, яким через 24 год після введення розчину карагеніну проводили терапію шляхом нанесення мазі з екстрактами на уражену кінцівку (2 рази на добу) упродовж 3 діб експерименту; третя група – тварини, яким проводили терапію в аналогічних умовах ібупрофеном у складі мазі (4 %). Через визначені проміжки часу після введення розчину флогогену (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 діб) вимірювали морфологічні показники ураженої кінцівки: ширину за допомогою електронного штангенциркуля та об'єм за допомогою плетизмометра. Ширину та об'єм запаленої кінцівки виражали у відсотках порівняно з вихідними даними неушкодженої кінцівки кожної тварини, які були виміряні на початку експерименту.

Аналгетичну дію екстрактів у складі мазі визначали в тесті термічного

подразнення («гаряча пластина») і хімічного подразнення з використанням розчину алілізотіоціанату (АІТЦ). У цих дослідях використовували білих безпородних мишей масою (20 ± 2) г, по 5 тварин у кожній групі. Аналгетичну дію мазі в разі термічного подразнення оцінювали за латентним періодом (час, с), протягом якого миші знаходились на гарячій пластині (55°C Hot plate-метр, Columbus Instruments, США) до відмикування кінцівок від поверхні пластилини та їхнє облизування. Експериментальні мазі наносили на поверхню кінцівок тварин за 30 хв до проведення тесту.

Аналгетичну дію мазі в разі хімічного подразнення оцінювали за сумарним часом прояву больової реакції – облизування ураженої кінцівки, спостереження проводили в прозорому боксі протягом 5 хв одразу після субплантарного введення в задню кінцівку розчину АІТЦ (20 мкл 0,5 % розчину в 1,2-пропіленгліколі). Як референтний препарат використовували також ібупрофен у складі мазі (4 %).

Статистичну обробку даних у досліді *in vivo* проводили з розрахунком середньоарифметичного значення (M) і похибки середнього (m) з використанням t-критерію Стьюдента та з застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA.

Усі експериментальні тварини перебували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до води та їжі при 12-год світловому режимі. Дослідження на тваринах проводили відповідно до рекомендацій «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986 р.) [21] та законодавства України (Закон України № 3447-VI «Про захист тварин від жорстокого поводження» [22] (протокол від 15.10.2013 № 1).

Результати та їх обговорення. За багатьма дослідженнями саме наявність у лікарських засобах і лікувальної косметичній продукції рослинних поліфенольних сполук і флавоноїдів забезпечує протизапальну, аналгетичну й антиоксидантну активність [23–26]. При розробці мазі необхідним етапом є дослідження оптимальних умов отримання біологічно активних речовин з *Juglans regia L.* За отриманими експериментальними даними було встановлено, що максимальний загальний вміст поліфенольних сполук (56,8 мг/г сухої сировини) реєструється в екстрактах з ядра зеленого плоду *Juglans regia L.*, який отримано в умовах попереднього кип'ятіння з наступною мацерацією (рис. 1, а).

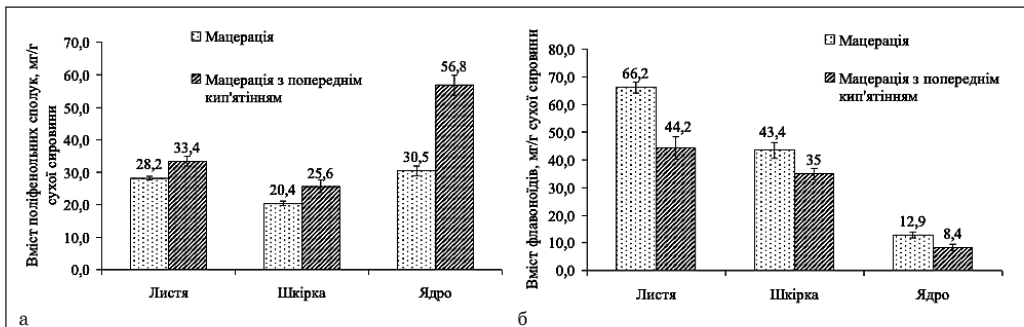


Рис. 1. Вміст біологічно активних сполук в екстрактах з листя та зеленого плоду *Juglans regia L.* залежно від умов екстракції:

а – вміст поліфенольних сполук; б – вміст флавоноїдів

У даному випадку попереднє кип'ятіння дозволяє збільшити вихід поліфенольних сполук з ядра горіху порівняно з мацерацією без кип'ятіння майже в 2 рази, що пов'язано зі збільшенням виходу цільових сполук внаслідок впливу на рослинну структуру ядра горіху та збільшенням процесів конвективної дифузії [27]. Найбільша кількість флавоноїдів (66,2 мг/г сухої сировини) вилучається зі свіжого листа *Juglans regia L.* в умовах звичайної мацерації (рис. 1, б), тоді як попереднє кип'ятіння екстракту призводить до зниження флавоноїдів майже в 1,5 разу, що може бути пов'язано з термічною деградацією даних сполук [28].

При дослідженні антиоксидантної (антирадикальної) дії експериментальних екстрактів за реакцією з DPPH радикалом було визначено, що максимальний відсоток знешкодження радикалу спостерігається в екстракті з листа *Juglans regia L.*, що отриманий методом мацерації, та з ядра зеленого плоду *Juglans regia L.*, що отриманий методом мацерації з попереднім кип'ятінням, з максимальною кількістю флавоноїдів і поліфенольних сполук відповідно (табл. 1).

Отримані дані корелюють з даними досліджень інших авторів, в яких

пов'язують антиоксидантну активність водних і метанольних екстрактів з різних частин *Juglans regia L.* саме з наявністю в них доволі високої концентрації поліфенольних сполук і флавоноїдів [29–31].

Для отримання мазі нами було обрано два екстракти, які містять найбільшу кількість поліфенольних сполук і флавоноїдів. Запропонована основа мазі являє собою дифільну систему, в якій розчиняються як ліпофільні, так і гідрофільні біологічно активні речовини екстрактів. До маzewої основи вводились густі екстракти з листа та ядра *Juglans regia L.* у кількості, яка необхідна для отримання 4 % мазі та містить по 2 % кожного з відповідних екстрактів.

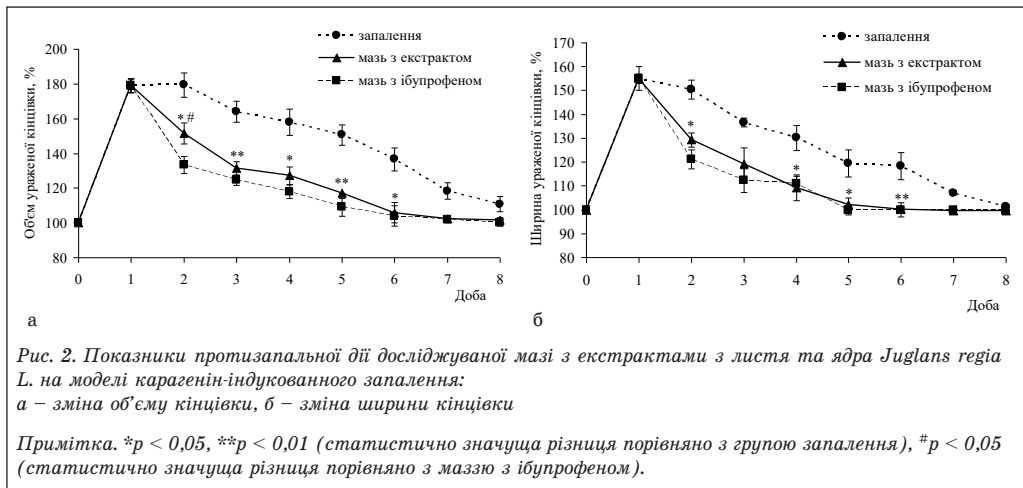
Протизапальну дію мазі вивчали на моделі карагенін-індукованого набряку кінцівки щурів. Субплантарне введення розчину карагеніну спричинило гострий набряк зі збільшенням об'єму та ширини ураженої кінцівки відповідно на 80 % та 60 % (рис. 2, а, б).

Запалення є стійким процесом, що збільшується з часом внаслідок виділення вазоактивних амінів (гістамін, брадикінін і серотонін) через 2 год після введення карагеніну; на 3 год відбувається вивільнення цитокінів

Таблиця 1

Антиоксидантна активність екстрактів з листа та зеленого плоду *Juglans regia L.*, %

| Умова екстрагування | Сировина <i>Juglans regia L.</i> | | |
|------------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|
| | листа | шкірка | ядро |
| Мацерація | 88,64 ± 0,12 | 86,11 ± 0,15 | 86,72 ± 0,20 |
| Мацерація з попереднім кип'ятінням | 87,61 ± 0,22 | 85,34 ± 0,24 | 88,56 ± 0,23 |



і кінців, на 6 год відбувається виділення простагландинів, оксиду азоту та радикалів кисню. Весь каскад перетворень підтримує запальну реакцію [32, 33]. Було встановлено, що лікування маззю з екстрактом протягом 3 дів експерименту призводить до достовірного зниження запальної реакції за двома показниками ураженої кінцівки порівняно з групою тварин без лікування. Досягнення вихідних значень ураженої кінцівки за об'ємом відбувається на 6 добу, за шириною – на 5 добу експерименту. Порівняно з ібупрофеном у складі мазі екстракти поступаються своєю дією лише на 1 добі лікування, в інші проміжки часу експериментальні дані не мають достовірної різниці. Упродовж усього часу експерименту завдяки використанню мазі з екстрактами біологічно активних речовин листя та ядра горіху вдалося знизити запальну реакцію в середньому на 20 % і 30 % за показниками об'єму та ширини кінцівки відповідно. Отримані дані корелюють з дослідженнями інших авторів, які припускають, що процес інгібування запалення під впливом біологічно активних речовин екстрактів з різних частин рослини

Juglans regia L. пов'язаний з пригніченням виділення запальних цитокинів, простагландинів; зі зменшенням ступеня ексудативної стадії запального процесу та з індукцією антиоксидантного захисту клітинних систем [34, 35]. З іншого боку, відомо, що карагенін є агоністом ванілоїдних рецепторів TRPV1, що являє собою ноцицептивний катіонний канал. Саме рослинні поліфенольні сполуки, флавоноїди здатні зв'язуватися з відповідними TRP-рецепторами [36, 37], проявляючи аналгетичну активність за рахунок зменшення сенсорного болювого подразнення [38]. Аналгетична дія мазі на основі екстракту виявлялася здатністю тварин наступати на уражену кінцівку на відміну від тих, яким лікування не проводилось.

Додатково аналгетичну дію мазі на основі екстрактів з *Juglans regia* L. досліджували за тестом «гаряча пластина», в якому болюва реакція мишей опосередкована активізацією відповідних TRP-рецепторів, а саме TRPV1 каналів, які активуються під дією високих температур шляхом збудження сенсорики нервових закінчень й індукуванням нейрогенного запалення внаслідок вивільнення певних нейропептидів [39].

Завдяки використанню мазі, яка містить екстракти *Juglans regia L.*, відбувається збільшення латентного періоду (у 3,4 разу відносно контролю) до початку появи больової реакції мишей, яких поміщають на гарячу пластину, причому дія мазі з екстрактами за результатами статистичного аналізу не відрізняється від дії мазі з ібупрофеном (табл. 2).

АІТЦ є селективним агоністом TRPA1-рецепторів, активація яких призводить до розвитку гострого болю шляхом пригнічення Са-опосередкованої відповіді в сенсорних нейронах задніх корінців і трійчастого нерва [40]. Аплікування мазі на основі екстрактів *Juglans regia L.* призводить до зменшення тривалості больової реакції мишей (у 2 рази відносно контролю) на введення подразника (розчину АІТЦ), дія мазі з екстрактом достовірно не відрізняється від дії мазі з ібупрофеном (табл. 2).

Висновки

Таким чином, проведене дослідження показало, що для максимального вилучення поліфенольних сполук (56,8 мг/г сухої сировини) необхідно

використовувати ядра зеленого плоду *Juglans regia L.* в умовах попереднього кип'ятіння з наступною мацерацією 70 % етанолом; для максимального вилучення флавоноїдів (66,2 мг/г сухої сировини) необхідно використовувати свіже листя *Juglans regia L.* в умовах мацерації 70 % етанолом. Антиоксидантна (антирадикальна) активність експериментальних екстрактів корелює з вмістом поліфенольних сполук та флавоноїдів, максимальне знешкодження DPPH радикала в обраних екстрактах і складає 88,56 % та 88,64 % відповідно.

На основі даних екстрактів була виготовлена 4 % мазь, яка виявила протизапальну активність на моделі карагенін-індукованого набряку за двома морфологічними показниками ураженої кінцівки, знижуючи запальний процес у середньому на 20 % (за об'ємом) і 30 % (за шириною кінцівки).

Було досліджено аналгетичну дію мазі в тестах «гаряча пластина» та «хімічного подразнення», в яких завдяки дії мазі відбувалось збільшення в 3,4 разу латентного часу до появи больової реакції (у тесті «гаряча пластина») та зменшення тривалості больової реакції

Таблиця 2

Показники аналгетичної дії досліджуваної мазі в тесті термічного («гаряча пластина») та хімічного (з використанням розчину алілізотіоціанату) подразнення ($M \pm m, n = 5$)

| Експериментальна група | Латентний період до появи больової реакції, с | Тривалість больової реакції, с |
|---|---|--------------------------------|
| | термічне подразнення | хімічне подразнення |
| 1. Контроль | 4,8 ± 2,2 | 61,1 ± 1,5 |
| 2. Мазь з екстрактами з листя та ядра <i>Juglans regia L.</i> | 16,5 ± 0,7* | 34,8 ± 2,5* |
| 3. Мазь з ібупрофеном | 14,1 ± 1,8* | 32,7 ± 1,4* |

Примітка. * $p < 0,05$ – статистично значуща різниця порівняно з контрольною групою.

в 2,0 разу (при введенні розчину АІПЦ), що може бути наслідком зв'язування рослинних біомолекул з відповідними TRP-рецепторами та додає анальгетичну складову до протизапальної активності мазі.

Поліфенольні сполуки та флавоноїди екстрактів *Juglans regia* L. у складі мазі виявляють протизапальну та анальгетичну дію, що робить їх перспективними для подальшого вивчення.

1. Acute inflammation and metabolism. M. L. Varela, M. Mogildea, I. Moreno, A. Lopes. *Inflammation*. 2018. V. 41 (4). P. 1115–1127. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0739-1>. PMID: 29404872.
2. Formulation of topical dosage forms containing synthetic and natural anti-inflammatory agents for the treatment of rheumatoid arthritis. T. Jurca, L. Józsa, R. Suciú et al. *Molecules*. 2020. V. 26 (1). P. 24–51. <https://doi.org/10.3390/molecules26010024>.
3. Radovanović K., Gavarić N., Aćimović M. Anti-inflammatory properties of plants from serbian traditional medicine. *Life*. 2023. V. 13 (4). P. 874–891. <https://doi.org/10.3390/life13040874>.
4. Plants as sources of anti-inflammatory agents. C. D. R. Nunes, M. Barreto Arantes, S. Menezes de Faria Pereira et al. *Molecules*. 2020. V. 25 (16). P. 3726–3748. <https://doi.org/10.3390/molecules25163726>. PMID: 32824133.
5. Chaachouay N., Zidane L. Plant-derived natural products: a source for drug discovery and development. *Drugs and Drug Candidates*. 2024. V. 3 (1) P. 184–207. <https://doi.org/10.3390/ddc3010011>.
6. Giri M. A., Bhalke R. D. Formulation and evaluation of topical anti-inflammatory herbal gel. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2019. V. 12 (7). P. 252–255. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2019.v12i7.33859>.
7. Medicinal plants from the Himalayan region as potential novel antimicrobial and anti-inflammatory skin treatments. M. Heinrich, H. Jiang, F. Scotti et al. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2021. V. 73 (7). P. 956–967. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgab039>.
8. Магуран В. К., Крамарець В. О. Фітосанітарний стан насаджень *Juglans regia* L. на території правобережного лісостепу України. *Науковий вісник НЛТУ України*. 2024. Т. 34 (3). С. 71–80. <https://doi.org/10.36930/40340309>.
9. Antibacterial effect of juglans regia bark extract at different concentrations against human salivary microflora. T. Aldawood, A. Alaa Alyousef, S. Alyousef et al. *Journal of Oral Medicine, Oral Surgery, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2017. V. 3 (4). P. 214–217. <https://doi.org/10.18231/2395-6194.2017.0051>.
10. Topical administration of Juglans regia L. leaf extract accelerates diabetic wound healing. D. Nasiry, A. R. Khalatbary, A. Ghaemi et al. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 2022. V. 22. P. 255–268. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03735-6>.
11. Structural characterization of phytochemical content, antibacterial, and antifungal activities of Juglans regia L. leaves cultivated in Algeria. A. Bennacer, F. Sahir-Halouane, S. AitSlimane-Aitkaki et al. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2022. V. 40. P. 102304–102312. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102304>.
12. Anti-inflammatory, antioxidant activity, and acetylcholinesterase inhibitory activity of leaf extract of Juglans regia: insight into the treatment of neurodegenerative diseases. O. R. Adebayo, B. M. Adegoke, J. O. Oladele et al. *Notulae Scientia Biologicae*. 2024. V. 16 (2). P. 11872–11888. <https://doi.org/10.55779/nsb16211872>.
13. Effects of Juglans regia root bark extract on platelet aggregation, bleeding time, and plasmatic coagulation: in vitro and ex vivo experiments. A. Amirou, M. Bnouham, A. Legssyer et al. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2018. V. 2018. P. 7313517–7313524. <https://doi.org/10.1155/2018/7313517>. PMID: 30186357; PMCID: PMC6112207.
14. Walnuts (*Juglans regia*) chemical composition and research in human health. D. Hayes, M. J. Angove, J. Tucci, C. Dennis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016. V. 56 (8). P. 1231–1241. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.760516>.
15. Aqueous extracts of walnut (*Juglans regia* L.) leaves: quantitative analyses of hydroxycinnamic and chlorogenic acids. A. L. Gutiérrez Ortiz, F. Berti, L. Navarini et al. *Journal of Chromatographic Science*. 2018. V. 56 (8). P. 753–760. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmy041>.
16. Optimization of extraction methods for total polyphenolic compounds obtained from rhizomes of *Zingiber officinale*. L. V. Eberle, A. O. Kobernik, O. I. Aleksandrova, I. A. Kravchenko. *Trends in Phytochemical Research*. 2018. V. 2 (1). P. 37–42.

17. Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). N. Siddiqui, A. Rauf, A. Latif, Z. Mahmood. *J. Taibah. Univ. Med. Sci.* 2017. V. 12 (4). P. 360–363. <https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2016.11.006>.
18. Spectrophotometric quantification of flavonoids in herbal material, crude extract, and fractions from leaves of *Eugenia uniflora* Linn. R. T. M. Ramos, I. C. F. Bezerra, M. R. A. Ferreira, L. A. L. Soares. *Pharmacognosy Res.* 2017. V. 9 (3). P. 253–260. https://doi.org/10.4103/pr.pr_143_16.
19. Антиоксидантні властивості рослинних екстрактів – стабілізаторів біодизелю. І. В. Лагута, О. М. Ставинська, П. О. Кузема та ін. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2021. № 2. С. 91–99. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2021.02.091>.
20. Evaluation of phytochemical and antioxidant potential of various extracts from traditionally used medicinal plants of Pakistan. S. A. A. Jafri, Z. M. Khalid, M. Z. Khan, N. U. Jomezai. *Open Chemistry.* 2022. V. 20. P. 1337–1356. <https://doi.org/10.1515/chem-2022-0242>.
21. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей. International documents (Council of Europe). 1986. URL: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/994_137#Text.
22. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». *Відомості Верховної Ради України.* 2006. № 27. С. 990.
23. Polyphenols and flavonoids composition, anti-inflammatory and antioxidant properties of Andean *Baccharis macrantha* Extracts. S. Rosero, F. Del Pozo, W. Simbaña et al. *Plants (Basel).* 2022. V. 11 (12). P. 1555–1574. <https://doi.org/10.3390/plants11121555>.
24. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant effects of phenolic compound from Algerian *Mentha rotundifolia* L. leaves on experimental animals. L. Boussouf, H. Boutennoune, M. Kebieche et al. *South African Journal of Botany.* 2017. V. 113. P. 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.003>.
25. The antioxidant, analgesic, anti-inflammatory, and wound healing activities of haplophyllum tuberculatum (Forsskal) A. juss aqueous and ethanolic extract. A. Agour, I. Mssillou, I. Es-safi et al. *Life.* 2022. V. 12 (10). P. 1553. <https://doi.org/10.3390/life12101553>.
26. Development and evaluation of herbal anti-inflammatory cream containing turmeric. S. Niyanta, P. Ritesh, G. Umang, P. Bhupendra. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* 2022. V. 13 (4). P. 78–82. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.130492>.
27. The Influence of subcritical water extraction parameters on the chemical composition and antioxidant activity of Walnut (*Juglans regia* L.) bark extracts. P. Kamiński, K. Tyśkiewicz, Z. Fekner et al. *Applied Sciences.* 2022. V. 12 (23). P. 12490–12504. <https://doi.org/10.3390/app122312490>.
28. Antony A., Farid M. Effect of temperatures on polyphenols during extraction. *Applied Sciences.* 2022. V. 12 (4). P. 2107–2122. <https://doi.org/10.3390/app12042107>.
29. Polyphenolic profile and antioxidant activity of *Juglans regia* L. leaves and husk extracts. A. Masek, M. Latos-Brozio, E. Chrzescijanska, A. Podsedek. *Forests.* 2019. V. 10 (11). P. 988–1002. <https://doi.org/10.3390/f10110988>.
30. Phenolic profile, antioxidant and antibacterial properties of *Juglans regia* L. (walnut) leaves from the northeast of Portugal. V. Vieira, C. Pereira, T. C. S. P. Pires et al. *Industrial Crops and Products.* 2019. V. 134. P. 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.020>.
31. Comparative investigation of chemical constituents of kernels, leaves, husk, and bark of *Juglans regia* L., using HPLC-DAD-ESI-MS/MS analysis and evaluation of their antioxidant, antidiabetic and anti-inflammatory activities. I. Bourais, S. Elmarrkechy, D. Taha et al. *Molecules.* 2022. V. 27 (24). P. 8989. <https://doi.org/10.3390/molecules27248989>.
32. Ramadoss S., Vishnupriya G. Anti-inflammatory effect of ethanolic extract of *Aegle marmelos* leaves on carrageenan-induced rat paw edema. *National J. of Physiology, Pharmacy and Pharmacology.* 2023. V. 13 (10). P. 2178–2182.
33. Anti-inflammatory effect of izaralpinin derived from *chromolaena leivensis*: λ -carrageenan-induced paw edema and in silico model. J. C. Mancipe, P. Vargas-Pinto, O. E. Rodríguez et al. *Molecules.* 2023. V. 28 (9). P. 3722–3736. <https://doi.org/10.3390/molecules28093722>.
34. Walnut (*Juglans regia* L.) septum: assessment of bioactive molecules and in vitro biological effects. M. E. Rusu, I. Fizesan, A. Pop et al. *Molecules.* 2020. V. 25 (9). P. 2187–2208. <https://doi.org/10.3390/molecules25092187>.
35. Preclinical rodent models of arthritis and acute inflammation indicate immunomodulatory and anti-inflammatory properties of *Juglans regia* extracts. A. Mobashar, A. Shabbir, M. Shahzad, G. Gobe. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2022. V. 2022. Article ID 1695701. P. 1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/1695701>.
36. Caterina M. J., Pang Z. TRP channels in skin biology and pathophysiology. *Pharmaceuticals.* 2016. V. 9 (4). P. 77–105. <https://doi.org/10.3390/ph9040077>.
37. Mickle A. D., Shepherd A. J., Mohapatra D. P. Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2015. V. 131. P. 73–118. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.01.002>. Epub 2015 Feb 12. PMID: 25744671; PMCID: PMC5903472.

38. Vriens J., Nilius B., Vennekens R. Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr. Neuropharmacol.* 2008. V. 6 (1). P. 79–96. <https://doi.org/10.2174/157015908783769644>.
39. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. O. Gouin, K. L'Herondelle, N. Lebonvallet et al. *Protein Cell.* 2017. V. 8 (9). P. 644–661. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0395-5>.
40. Polysulfide evokes acute pain through the activation of nociceptive TRPA1 in mouse sensory neurons. Y. Hatakeyama, K. Takahashi, M. Tominaga et al. *Molecular Pain.* 2015. V. 11. P. 11–24. <https://doi.org/10.1186/s12990-015-0023-4>.

**О. І. Александрова, О. О. Нефьодов, А. О. Цісак, Л. В. Еберле,
І. М. Радаєва, О. В. Устянська, О. І. Грицук**

Розробка мазі на основі екстрактів з листя та зелених плодів *Juglans regia L.* з протизапальною й аналгетичною дією

Сьогодні велика увага приділяється терапії запальних процесів, які супроводжують багато захворювань. У даному напрямі здійснюється активний пошук лікарських засобів рослинного походження з комплексною дією.

Мета дослідження – визначення оптимальних умов екстракції біологічно активних речовин з листя та зелених плодів *Juglans regia L.* для подальшого використання отриманих екстрактів у складі мазі з потенційною протизапальною та аналгетичною дією.

Для дослідження вмісту поліфенольних сполук і флавоноїдів в екстрактах використовували спектрофотометричні методи аналізу; антиоксидантну (антирадикальну) активність екстрактів визначали спектрофотометричним методом з ДФПГ (DPPH) реактивом; протизапальну активність 4 % мазі на основі екстрактів з листя та зелених плодів *Juglans regia L.* досліджували на моделі карагенін-індукованого набряку задньої кінцівки в щурів; аналгетичну активність – за тестами термічного («гаряча пластина») та хімічного подразнення на мишах. Як референтний препарат використовували 4 % мазь з ібупрофеном.

Було встановлено, що екстракт з листя *Juglans regia L.*, виготовлений в умовах мацерації, містить максимальну кількість флавоноїдів, екстракт з ядра плоду, виготовлений в умовах мацерації з попереднім кип'ятінням містить максимальну кількість поліфенольних сполук. Максимальна антиоксидантна активність була зареєстрована саме для даних екстрактів, які були обрані для виготовлення 4 % мазі та визначення її протизапальної й аналгетичної дії.

На моделі карагенін-індукованого набряку було показано, що застосування мазі на основі екстрактів призводить до гальмування запального процесу порівняно з тваринами, яких не лікували, зменшуючи ширину та об'єм ураженої кінцівки протягом усього експерименту в середньому на 30 % і 20 % відповідно. Дія мазі з екстрактом поступається препарату порівняння лише на першу добу використання, в інші терміни спостереження відмінності не були статистично значущими. Аналгетична дія мазі на основі екстрактів збільшує (у 3,4 разу від контролю) латентний час до появи больової реакції мишей у тесті «гаряча пластина» та зменшує тривалість больової реакції (у 2,0 разу від контролю) у тесті хімічного подразнення алізізотіоціанатом. Мазь на основі екстрактів не поступалася аналгетичній дії мазі з ібупрофеном.

Таким чином, було виготовлено 4 % мазь на основі густих екстрактів з листя та ядра зелених плодів *Juglans regia L.*, що містять найбільшу кількість флавоноїдів і поліфенольних сполук і виявляють максимальну антиоксидантну активність. Запропонована мазь характеризується протизапальною й аналгетичною дією, що свідчить про доцільність подальших досліджень у даному напрямі.

Ключові слова: екстракт, горіх волоський (*Juglans regia L.*), поліфеноли, флавоноїди, мазь, протизапальна дія, аналгетична дія

**О. І. Aleksandrova, O. O. Nefodov, L. V. Eberle, A. O. Tsisak,
I. M. Radaieva, O. V. Ustianska, A. I. Gritsuk**

Development of ointment based on extracts from the leaves and green fruits of *Juglans regia L.* with anti-inflammatory and analgesic effects

Today, much attention is paid to the therapy of inflammatory processes that accompany many diseases. In this direction, an active search for medicinal products of plant origin with a complex effect is carried out.

The aim of the study was to determine the optimal conditions for the extraction of biologically active substances from the leaves and green fruits of *Juglans regia L.* for their further use in the composition of the ointment with potential anti-inflammatory and analgesic effects.

Spectrophotometric methods of analysis were used to study the content of polyphenolic compounds and flavonoids in the extracts; the antioxidant (antiradical) activity of the extracts was determined by the spectrophotometric method using the DPPH reagent; the anti-inflammatory activity of 4% ointment based on extracts from the leaves and green fruits of *Juglans regia L.* was studied on the model of carrageenan-induced edema of the hind limb in rats; analgesic activity – according to the «hot plate» and «chemical irritation» tests on mice. 4% ointment with ibuprofen was used as a reference drug.

It was established that the extract from the leaves of *Juglans regia L.*, prepared under conditions of maceration, contains the maximum amount of flavonoids, the extract from the core of the fruit, prepared under the conditions of maceration with preliminary boiling, contains the maximum amount of polyphenolic compounds. The maximum antioxidant activity was registered precisely for these extracts, which were chosen to prepare 4% ointment and study its anti-inflammatory and analgesic effects.

In a model of carrageenan-induced edema, it was shown that the application of an extract-based ointment leads to an inhibition of the inflammatory process compared to untreated animals, reducing the width and volume of the affected limb throughout the experiment on average by 30% and 20%, respectively. The effect of the ointment with the extract was inferior compared to ibuprofen only on the first day of its use, in other observation intervals the differences were not statistically significant. Analgesic effect of ointment based on extracts increases (3.4 times compared to the control) the latent time of a painful reaction manifestation in the «hot plate» test and reduces the duration of the painful reaction (2 times compared to the control) in chemical irritation test with allyl isothiocyanate on mice. The algesic effect of extract-based ointment is not inferior to the action of ointment with ibuprofen.

Thus, a 4% ointment was made based on thick extracts from the leaves and core of the green fruits of *Juglans regia L.*, which contain the largest amount of flavonoids and polyphenolic compounds and exhibit maximum antioxidant activity. The proposed ointment has an anti-inflammatory and analgesic effects, which indicates the expediency of further research in this direction.

Key words: extract, Juglans regia L., polyphenols, flavonoids, ointment, anti-inflammatory effect, analgesic effect

ORCID ID авторів:

Александрова О. І. (ORCID ID 0000-0002-5930-6843);

Нефьодов О. О. (ORCID ID 0000-0002-5796-1852);

Еберле Л. В. (ORCID ID 0000-0002-3466-8653);

Цісак А. О. (ORCID ID 0000-0003-3766-5156);

Радаєва І. М. (ORCID ID 0000-0002-3730-2788);

Устянська О. В. (ORCID ID 0000-0002-4734-7066);

Грицук О. І. (ORCID ID 0000-0001-7470-0286).

Надійшла: 02 липня 2024 р.

Прийнята до друку: 27 листопада 2024 р.

Контактна особа: Александрова Олександра Ігорівна, кандидат біологічних наук, доцент, кафедра фармакології та технології ліків, Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, буд. 14, вул. Єлісаветинська (Щепкіна), м. Одеса, 65026. Тел.: + 38 0 48 723 82 64. Електронна пошта: alexsa713135@gmail.com