

ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНСКОЙ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Научно-практический журнал

2
2016



ВОПРОСЫ БИОЛОГИЧЕСКОЙ, МЕДИЦИНСКОЙ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Ежемесячный научно-практический журнал (включен в перечень ВАК,
представлен в международной реферативной базе Chemical Abstracts)
Основан в 1998 г.

№ 2,
2016

СОДЕРЖАНИЕ

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Лапа Г.Б., Толкачев О.Н.

Использование кислотокатализируемой циклизации нитрилов
в синтезе 3-аминоизохинолинов (обзор) 3

Куркин В.А.

Метаболиты лекарственных растений
как биологически активные соединения. 15

Копытько Я.Ф.

Химический состав, применение и стандартизация
Petroselinum crispum настойки гомеопатической матричной 23

Нилу Синха, Амиита Джасвал, Садхана Шривастава,

Мохеддин Салим Реши, Чхави Утра, Сангита Шукла

Исследование антиоксидантной активности
Phyllanthus amarus in vitro 33

ВОПРОСЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

Багинская А.И., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н., Воскобойникова И.В., Колхир В.К.

Экспериментальное моделирование в гастроэнтерологии.
Практические рекомендации.
Часть I. Изучение секреторной функции желудка;
оценка язвенных поражений 34

Сохарев А.С., Краснов К.А., Будаев А.В., Плотникова Е.Ю.

Экспериментальный способ консервации печеночного трансплантата 43

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Самохина Л.С., Ганина В.И., Ионова И.И., Комолова Г.С., Головин М.А.

Бифидогенные свойства пептидов лактоферрина из коровьего молока 49



Учредитель

Всероссийский
научно-исследовательский
институт лекарственных
и ароматических растений (ВИЛАР)

Главный редактор

В.А. БЫКОВ академик РАН

Заместители главного редактора

Е.С. СЕВЕРИН член-корр. РАН
Н.Е. КУШЛИНСКИЙ член-корр. РАН
Т.А. СОКОЛЬСКАЯ д.фарм.н.
А.В. СКАЛЬНЫЙ д.м.н.

Ответственный секретарь

И.В. МАТВЕЙЧУК д.б.н.

Редакционная коллегия

Ю.М. ЛОПУХИН академик РАН
Л.Ф. ПАНЧЕНКО академик РАН
В.И. ШВЕЦ академик РАН
Г. ВИКМАН (Швеция) д.б.н.
Т.Д. ДАРГАЕВА д.фарм.н.
Д.Г. ДЕРЯБИН д.м.н.
В.К. КОЛХИР д.м.н.
Х. ЛОНБЕРГ (Финляндия) д.х.н.
П.Г. МИЗИНА д.фарм.н.
В.И. ОСИПОВ д.б.н.
Е.И. САКАНЯН д.фарм.н.
Н.И. СИДЕЛЬНИКОВ д.с.-х.н.
О.Н. ТОЛКАЧЕВ д.х.н.
В.А. ФРОЛОВ д.м.н.
Н.Н. ЧЕРНОВ д.б.н.
А.Р. ГРАБЕКЛИС к.б.н.

Издатель
ООО Издательский дом
«Русский врач»

Адрес издателя и редакции:
119048, Москва, ул. Усачева,
д. 11 (1-й этаж)
Телефон: (499) 246-84-02

Отдел подписки:
Самойлов Геннадий Борисович
Телефон: (499) 246-79-83
E-mail: podpiska@rusvrach.ru

Отдел рекламы:
Данилова Надежда Григорьевна
Телефон: (915) 313-32-22
E-mail: pr-median@ya.ru

Web-site:
rusvrach.ru

E-mail:
verstka@rusvrach.ru

Выход в свет 24.02.16
Цена свободная
Заказ №2539-2-16

Тираж 1000 экз.

Отпечатано в типографии:
ООО «Ай-клуб», 119146, Москва,
Комсомольский пр., д. 28

Свидетельство о регистрации:
ПИ №ФС77-24708
от 22.06.2006 г.

PROBLEMS OF BIOLOGICAL, MEDICAL AND PHARMACEUTICAL CHEMISTRY

The monthly scientific journal (included in the list of VAK,
presented in the International Database Chemical Abstracts)
Founded in 1998

№ 2,
2016

TABLE OF CONTENTS

PHARMACEUTICAL CHEMISTRY

Lapa G.B., Tolkachev O.N.

Application of the acid promoted cyclization of nitriles
for the synthesis of 3-aminoisoquinolines (review) 13

Kurkin V.A.

The metabolites of the medicinal plants
as the biologically active coymounds 21

Kopytko Ya.F.

Chemical composition, application and standardization
of *Petroselinum crispum* homeopathic mother tinctures 29

Neelu Sinha, Amita Jaswal, Sadhana Shrivatsava,

Mohd. Salim Reshi, Chhavi Uthra, Sangeeta Shukla

In vitro evaluation of antioxidant potential
of *Phyllanthus amarus* – a magical herb 30

PROBLEMS OF EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE

Baginskaya A.I., Ferubko E.V., Kurmanova E.N., Voskoboinikova I.V., Kolkhir V.K.

Experimental modelling in gastroenterology.
Practical guidelines.
Part 1. Study of gastric secretory function, assessment of ulcerative lesions 42

Soharev A.S., Krasnov K.A., Budaev A.V., Plotnikova E.Y.

The experimental method of preserving liver transplant 47

BIOLOGICAL CHEMISTRY

Samokhina L.S., Ganina V.I., Ionova I.I., Komolova G.S., Golovin M.A.

Bifidogenic properties of lactoferrin peptides of cow milk 53



Founder

All-Russian
Scientific Research Institute
of Medical and Aromatic Plants
(Moscow)

Editor-in-Chief

V.A. BYKOV academician RAS

Deputy Editor

E.S. SEVERIN corr. member RAS
N.Ye. KUSHLINSKII corr. member RAS
T.A. SOKOLSKAYA Dr.Sc. (Pharm.)
A.V. SKALNY Dr.Sc. (Med.)

Executive Secretary

I.V. MATVEYCHUK Dr.Sc. (Biol.)

Editorial board

Yu.M. LOPUKHIN academician RAS
L.F. PANCHENKO academician RAS
V.I. SHVETS academician RAS
G. WIKMAN (Sweden) Ph.D. (Biol.)
T.D. DARGAEVA Dr.Sc. (Pharm.)
D.G. DERYABIN Dr.Sc. (Med.)
V.K. KILKHIR Dr.Sc. (Med.)
H. LONNBERG (Finland) Ph.D. (Chem.)
P.G. MIZINA Dr.Sc. (Pharm.)
V.I. OSIPOV Dr.D. (Biol.)
Ye.I. SAKANYAN Dr.Sc. (Pharm.)
N.I. SIDELNIKOV Dr.Sc. (Agric.)
O.N. TOLKACHOV Dr.D. (Chem.)
V.A. FROLOV Dr.Sc. (Med.)
N.N. CHERNOV Dr.Sc. (Biol.)
A.R. GRABEKLIS Ph.D. (Biol.)

Publisher
Publishing House
«Russkiy Vrach»

Address of the Editorial office and publisher:
119048, Moscow, 11, Usacheva str.,
corp. 17 (1st floor)
Tel.: (499) 246-84-02

Department of subscription:
Samoilov G.B.
Tel.: (499) 246-79-83
E-mail: podpiska@rusvrach.ru

Department of marketing:
Danilova N.G.
Tel.: (915) 313-32-22
E-mail: pr-median@ya.ru

Web-site:
rusvrach.ru

E-mail:
verstka@rusvrach.ru
Signed for publication
24.02.16
Order №2539-2-16

Printed at:
«I-Club» printing-house, 119146,
Moscow, 28, Komsomolsky prospect

Certificate of registration:
Journal was registered by the Press
Committee of the Russian Federation
under №ФЦ77-24708
on 22.06.2006

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КИСЛОТОКАТАЛИЗИРУЕМОЙ ЦИКЛИЗАЦИИ НИТРИЛОВ В СИНТЕЗЕ 3-АМИНОИЗОХИНОЛИНОВ (ОБЗОР)

Г.Б. Лапа

к.х.н., ст. науч. сотрудник, Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина (Москва)

E-mail: lapa_g@mail.ru

О.Н. Толкачев

д.х.н., профессор, Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

E-mail: vilarnii@mail.ru

Рассмотрены примеры кислотокатализируемой реакции циклоконденсации арилацетонитрилов в синтезе 3-аминоизохинолинов и их функциональных производных, в том числе аналогов природных алкалоидов. Приведены механизмы превращений в процессе их получения, данные биологической активности синтезированных соединений, а также краткое изложение литературных данных по рассматриваемому вопросу.

Ключевые слова: 3-аминоизохинолины, синтез, механизм реакции, биологическая активность.

Изохинолины – широко распространенная гетероциклическая система биогенетически родственных природных соединений, фрагментов природных бензилизохинолиновых, бисбензилизохинолиновых, бензо[с]фенантридиновых, спиробензилизохинолиновых, апорфиновых, протоберберининовых и других алкалоидов. Многие из них широко используются в медицине в качестве лекарственных препаратов. Источниками их получения являются растения многих семейств, однако в связи с невысоким содержанием многих алкалоидов в природных источниках и многокомпонентным составом производство индивидуальных природных соединений – дорогостоящая задача. Разработка альтернативных методов получения алкалоидов синтетическим путем оказала существенное влияние не только на развитие химии природных соединений, но и на синтетическую органическую химию в целом. Поскольку синтез большинства 1-бензилизохинолиновых алкалоидов классическими методами является многостадийным процессом, поиск простого и экономичного способа их получения является актуальной задачей. В обзоре [1] представлены примеры изохинолиновых алкалоидов и их биологическая активность.

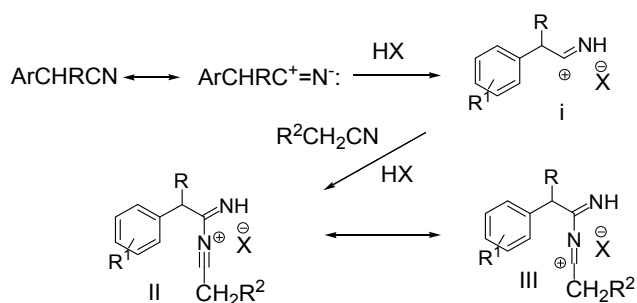
Обстоятельный обзор представил А.В. Середа по методам синтеза изохинолиновых соединений, он осветил современные представления о роли нитрильных солей в механизме их образования [2]. В отделе фитохимии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарствен-

ных и ароматических растений» (ВИЛАР) разработан новый одностадийный метод синтеза (*one pot synthesis*) 3-аминоизохинолинов и соответствующих 3-имидаминопроизводных путем кислотокатализируемой циклоконденсации (КЦК) трех молекул арилацетонитрилов, содержащих алкоксигруппы. Ранее синтез подобных соединений был малодоступным. Новые сведения относительно химии 3-аминоизохинолинов делают необходимым провести более обстоятельное обобщение методов их синтеза с помощью КЦК нитрилов и рассмотреть некоторые аспекты механизма этой реакции. Наличие в них незамещенной аминогруппы представляет большой интерес для их использования в синтезе новых биологически активных функционально замещенных производных.

Ц е л ь р а б о т ы – дать краткий обзор состояния проблемы по химии 3-аминоизохинолинов с упором на исследования, проведенные в ФГБНУ ВИЛАР.

КИСЛОТОКАТАЛИЗИРУЕМЫЕ РЕАКЦИИ КОНДЕНСАЦИИ НИТРИЛОВ: СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА

На свойстве поляризуемости нитрильной группы, углерод которой обладает электрофильным, а азот нуклеофильным характером, построено все многообразие кислотокатализируемых реакций с ее участием:



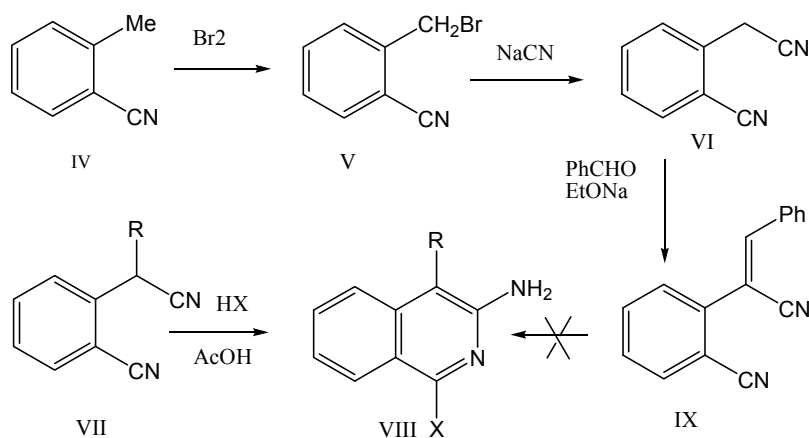
Одними из первых упомянули о реакциях нитрилов с подобными соединениями, с аминами, а также с различными карбокатионами в обзорах Т. Richardson и R. Robinson [4–7]. Циклизация нитрилов включает в себя взаимодействие двух CN-групп, одна из которых под действием кислоты генерирует карбокатион нитрилевой соли (I), а нуклеофильный атом азота реагирует со свободной CN-группой, образуя равновесную смесь иминиевого катиона (II) и карбокатиона (III). Поэтому важно, чтобы ионы карбония (I) были достаточно стабильными, поскольку CN-группа – плохая ловушка для ионов карбония, как утверждается в об-

зоре [7]. Дальнейшие превращения карбокатиона (III) зависят от электронодонорных свойств и положения радикалов R в ароматическом кольце, стерического влияния радикалов R¹, а также нуклеофильности анионов X⁻. Соединения формулы III гидролизуются в соответствующие имиды.

В [3] сообщено о получении при взаимодействии гомовератронитрила (3,4-диметоксифенилацетонитрила, ДМФАН) с хлористым водородом в эфире продукта с т. пл. 140–142 °С, структура которого не была установлена. А.В. Середа охарактеризовал выделенные вещества, изучил их строение, влияние среды и условий реакции на динамику процесса [2]. Эта работа дала импульс к обобщению в нашем обзоре реакций на основе общего механизма.

ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ 3-АМИНОИЗОХИНОЛИНОВ МЕТОДАМИ КЦК

В синтезе 3-амино-1-бромизохинолинов (VIII, R = H, PhCH₂, X = Hal) использована внутримолекулярная КЦК динитрилов (V–VI) [8–10]:

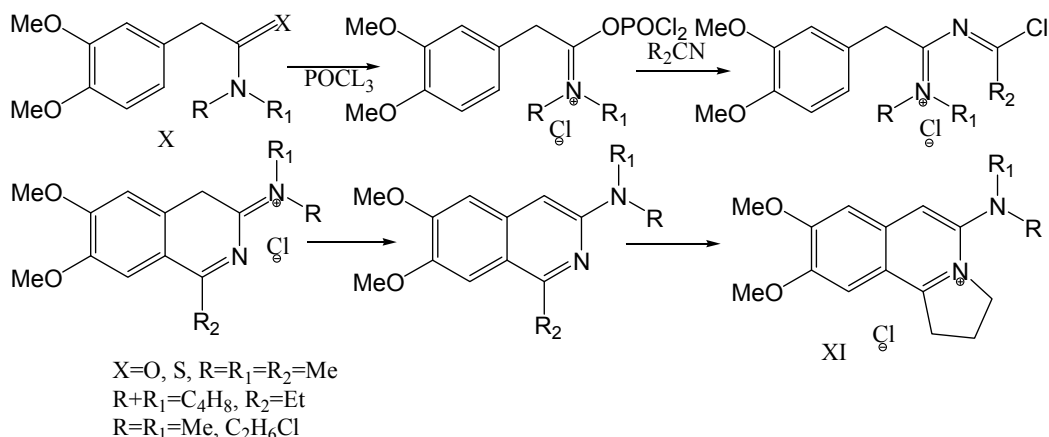


Ф. Johnson с соавт. сделали заключение, что циклизация в 3-аминоизохинолины определяется большей стабильностью карбокатиона алифатической нитрилевой соли в динитриле (VI) [9, 10]. В [11] показано, что в условиях щелочного катализа направление реакций зависит от природы реагентов. Обсуждены вопросы образования и раскрытия циклов в динитрилах под действием амида натрия в среде жидкого аммиака. В этом случае 4-бром-3-аминоизохинолин превращается не в 3,4-диаминоизохинолин, а через предполагаемый нитрен перегруппировывается в 1-цианизоиндол аналогично перегруппировке Вольфа.

Полученный из PhCH₂COCl и ClCN (через

промежуточный карбокатион) 1-хлор-3-аминоизохинолин (VIIIa, R = H, X = Cl) использован как синтон для производства фунгицидов различного назначения [12]. Полученный циклизацией динитрила (VII, R = Ph) 1-бром-3-амино-4-фенилизохинолин (VIIIb, R = Ph, X = Br) дегалогенированием над Pt/C превращали в 3-амино-4-фенилизохинолин (VIIIc, R = Ph, X = H) [13].

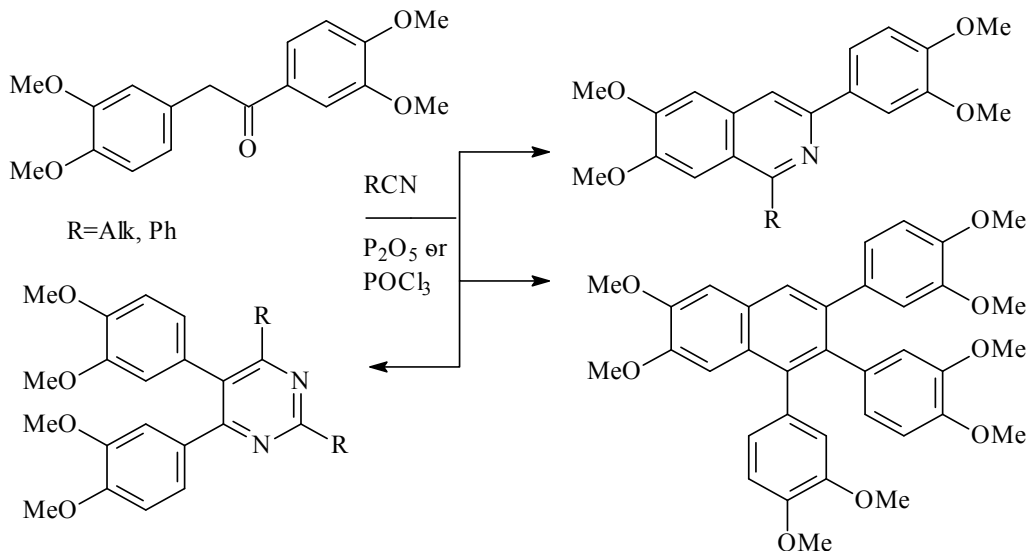
Удобный синтез функционально замещенных 3-аминоизохинолинов предложил А. Лиера [14], согласно которому амиды или тиоморфолиды гомовератровой кислоты (X) циклизовали по реакции Вильгеродта–Киндлера, используя различные нитрилы в построении изохинолинового цикла:



Амиды удобны для получения стабильных карбокатионов при воздействии $POCl_3$ в различных модификациях реакции Риттера. А. Garcia с соавт. [15] рассматривали данную схему и как простой способ синтеза сочлененных гетероциклов типа XI с помощью дифункциональных агентов, таких как $Cl(CH_2)_3CN$.

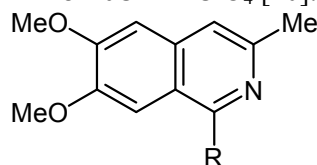
Основное преимущество такого получения изохинолиновых производных заключается в простоте

построения гетероцикла через нитрильную группу, причем образование стабильных карбокатионов, доступных для атаки нитрильными группами, является основным условием их синтеза. В работе [15] описано образование нитрильных карбокатионов из гомовератроил-вератрола, механизм включения CN-группы в гетероцикл, влияние природы заместителей R и условий реакции на соотношение изохинолинов, нафталинов и пиримидинов:

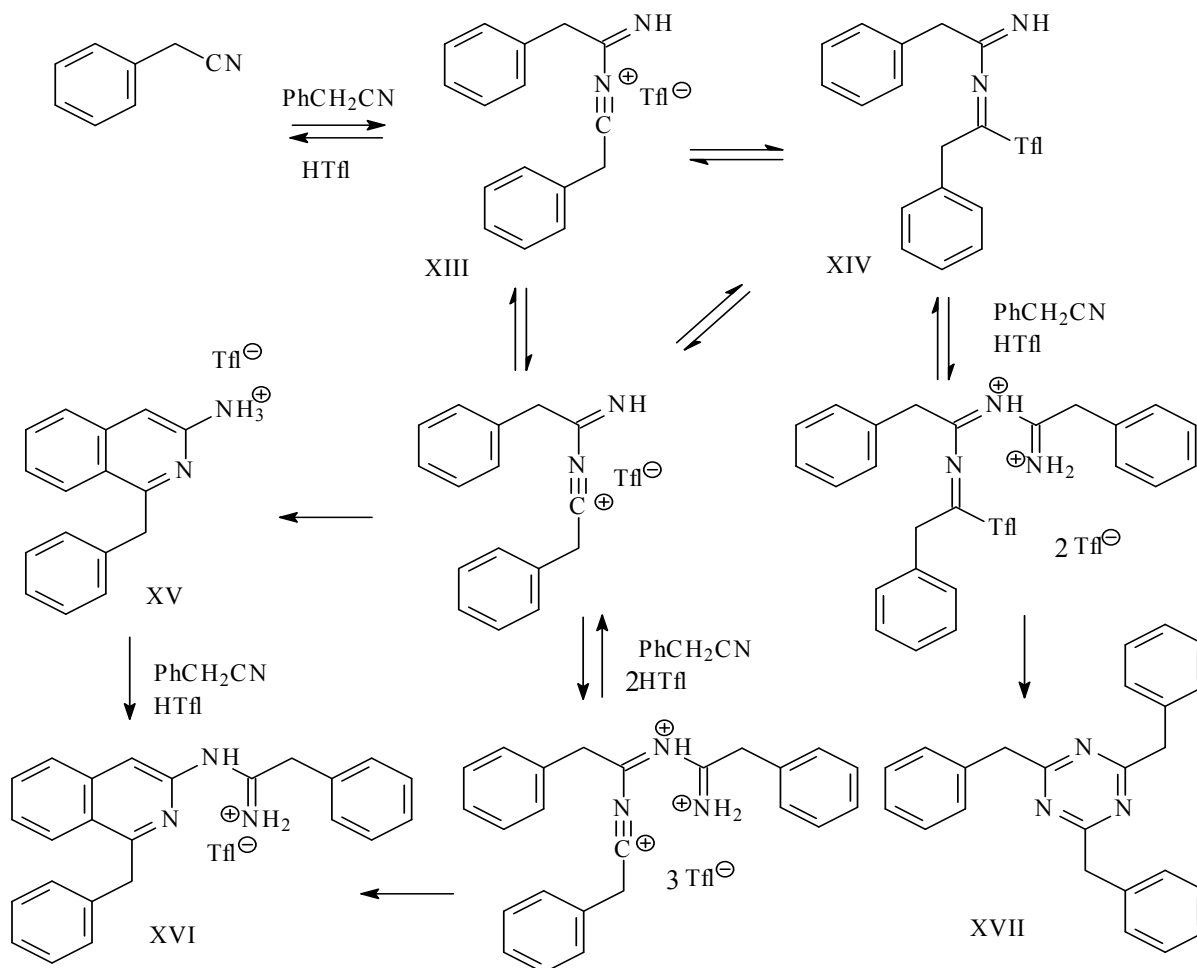


Получение незамещенных в ароматическом цикле 5-фенил-6-алкил-4-аминопиримидинов из 3-оксоалканонитрилов и формамида по реакции Бишлера–Напиральского протекает через образование равновесной смеси изомерных енаминонитрилов [16, 17]. В работах [13, 18] при взаимодействии двух сближенных CN-групп в дигиан-производном получены замещенные 4-фенил-3-аминоизохинолины с целью использования данного подхода в синтезе изохинолиновых алкалоидов [19].

В.Г. Бровченко с соавт. синтезировали 3-метилизохинолины (XII, R = Me, Ph, H, Ac, 3,4-(MeO)₂C₆H₃CH₂) в условиях реакции Риттера, используя в качестве катализатора образования нитрильного карбокатиона ацетилперхлорат, полученный из $AcCl$ и $HClO_4$ [20]:



В.Л. Booth и А. Collis разработали одностадийный синтез 1-бензил-3-аминоизохинолинов реакцией циклотримеризации арилацетонитрила [21]:



Из ряда изученных кислот только CF₃SO₃H и в меньшей степени FSO₃H были пригодны для реакции циклотримеризации. Использовались ArCH₂CN и его производные, содержащие радикалы первого типа (Cl, F, Me, OMe, OAc, а также α-циклогексил). Наилучшими растворителями оказались Et₂O, PhMe и MeNO₂. Отмечено, что направление КЦК в основном зависит от таутомерного равновесия между нитрилевой солью (XIII) и псевдогалогенимином (XIV) (галогенимином), а также от нуклеофильности противоиона (CF₃SO₃⁻ или Cl⁻). Так, CF₃SO₃H смещает равновесие PhCH₂CN в сторону карбокатиона, образуя 1-бензил-3-бензилимидамино-изохинолин (XVI) (выход 95%) и 2,4,6-трибензил-симм-триазин (XVII) (выход 3%), а хлорид-ион катализирует реакцию тримеризации в симм-триазин. Однако при попытке получить 3-аминопапаверин из ДМФАН

в данных условиях были выделены лишь полимерные продукты.

Японские авторы [22] из 2-индолилацетонитрила в MeCN под действием AlCl₃ синтезировали 3-амино-1-метил-5H-пиридо[4,3-b]индол. В серии более 370 публикаций М.Н. Elnagdi с соавт. (до 2008 г.) показали перспективность использования метода КЦК в синтезе различных гетероциклических систем [23].

ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ 3-АМИНОИЗОХИНОЛИНОВ В ФГБНУ ВИЛАР

Нами в результате удачного подбора реагентов и условий реакции КЦК из ДМФАН и HCl получены с высокими выходами замещенные 3-имидамино-1-бензилизохинолины (XXI) и другие гетероциклические системы, представленные ниже [24, 25]:

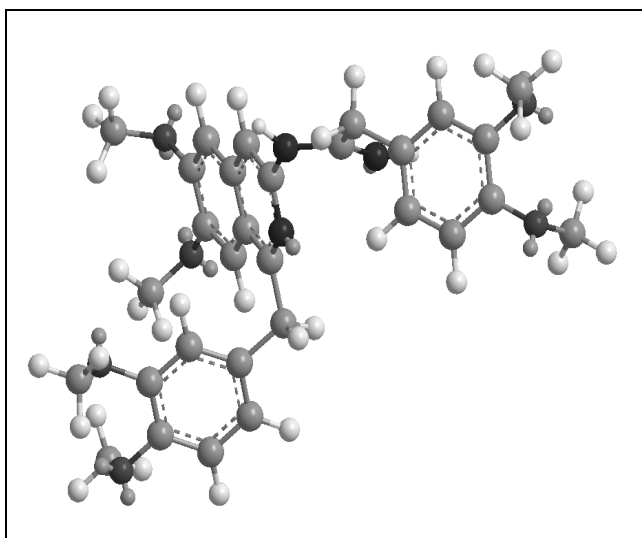
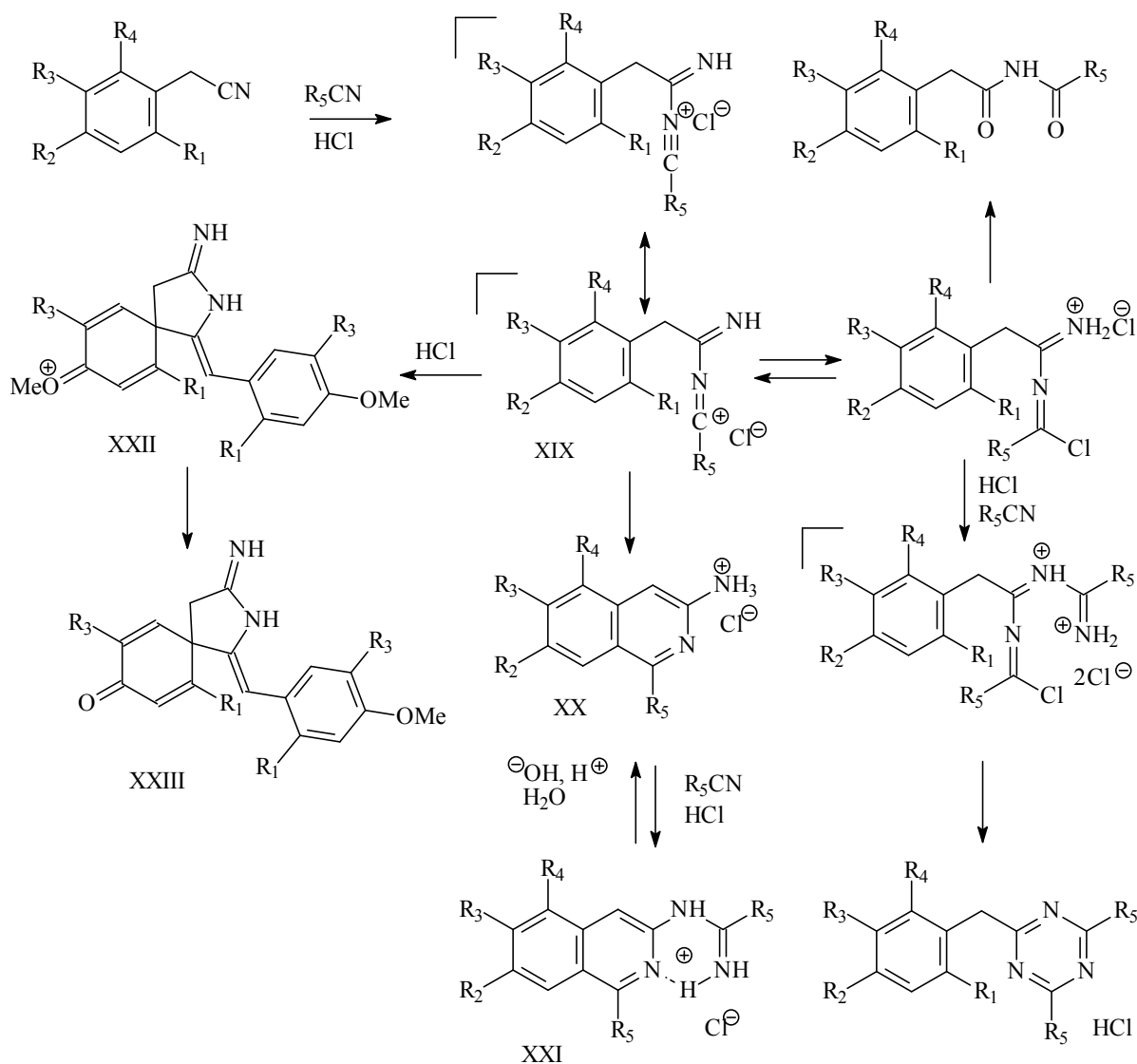


Рис. 1. 3D-модель 3-гомовератрил-имидоил-аминопапаверина гидрохлорида ($\Sigma E = 12,74$ ккал/моль)

Показано, что арилацетонитрилы с электронодонорными OMe группами в ароматическом кольце легко вступают в КЦК [26–29]. Они оказались удобной мишенью для электрофильного замещения достаточно стабильного карбокатиона (XIX, $R_1 = H$). Промежуточный 3-аминопапаверина гидрохлорид (XXa, $R_4 = H, R_2 = R_3 = OMe, R_5 = CH_2C_6H_3(OMe)_{2-3,4}$ ГХ) с избытком ДМФАн в условиях реакции образует (XXIa $R_4 = H, R_2 = R_3 = OMe, R_5 = CH_2C_6H_3(OMe)_{2-3,4}$), компьютерная молекулярная модель которого приведена на рис. 1 (ChemOffice 2004, 3D, MM2).

Установлено влияние природы и положения заместителей в ароматическом кольце на направление КЦК [2, 26–29]. Например, 4-метоксибензилцианид и 6-бром-ДМФАн с замещенным *para*-положением к метоксигруппе в ароматическом цикле циклизуются в *intra*-положение, образуя по-

сле деметилирования промежуточного катиона (XXII) спиродиенон (XXIII). Таким образом, подтверждена взаимосвязь региоселективности реакции циклизации с электронодонорным характером и положением заместителей в ароматическом кольце стерическими факторами, а также нуклео-

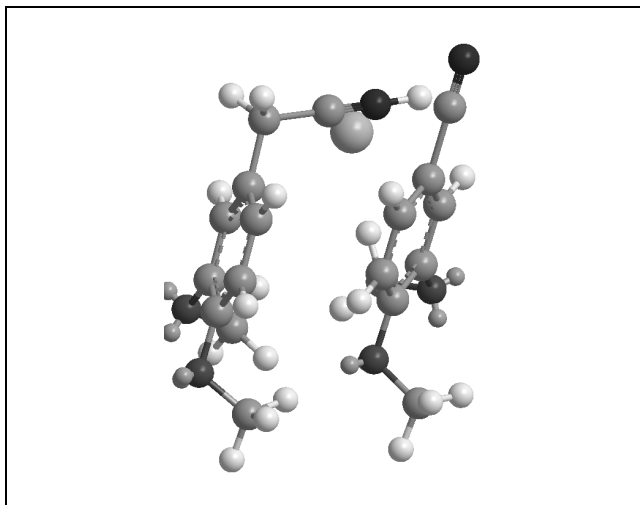


Рис. 2. Молекулярный ассоциат гомовратронитрилий хлорида с гомовратронитрилом ($\Sigma E = -73,499$ ккал/моль)

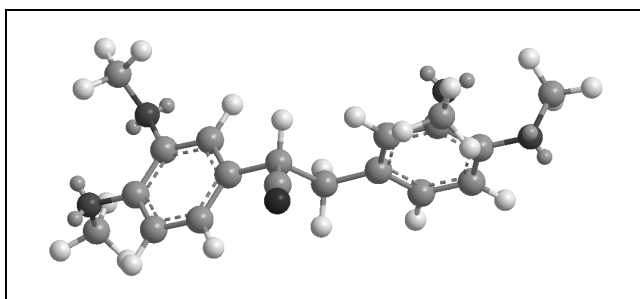


Рис. 3. Пространственная молекулярная модель *альфа*-гомовратририл-гомовратронитрила ($\Sigma E = 10,785$ ккал/моль)

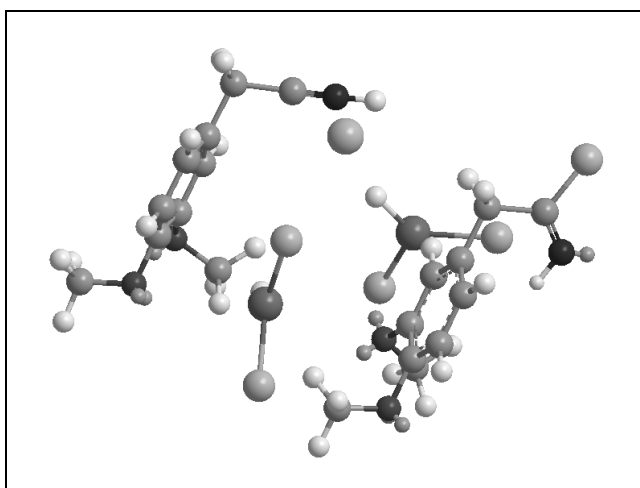


Рис. 4. Молекулярная компьютерная модель ассоциата гомовратронитрилий хлорида с гомовратронитрилом и хлоридом цинка ($\Sigma E = -79,36$ ккал/моль)

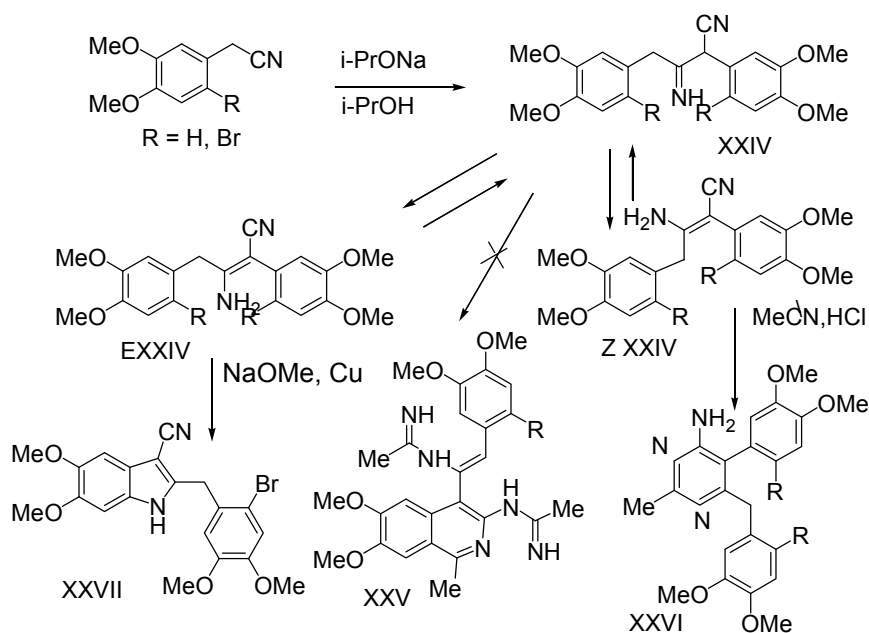
фильностью галогеноводородных или псевдогалогеноводородных кислот.

Методом молекулярного моделирования показано, что в реакции КЦК в качестве промежуточного соединения образуется димерный ассоциат гомовратрилий хлорида с гомовратронитрилом, компьютерная молекулярная модель которого приведена на рис. 2, где видно, что активные группы молекул в ассоциате сближены.

Показано, что ДМФАН с избытком другого нитрила образует 1-R-замещенные-3-аминоизохинолины (XX, $R_5 = \text{PhCH}_2-, \text{Ph}-, \text{Me}-$). В реакции КЦК можно также использовать амиды кислот или оксимы, образующие в среде POCl_3 соответствующие нитрилы. В арилацетонитрилах, имеющих в α -положении бензильную или полиметоксибензильную группы, происходит инактивация CN-группы. Компьютерным моделированием показано, что в них CN-группа выведена из плоскости сопряжения с ароматическим ядром более тяжелой бензильной группой, понижая таким образом ее реакционную способность (рис. 3) [29]. Реакция КЦК осуществима также с фенольными арилацетонитрилами, полученными по оригинальной методике [30]. Синтезирован ряд димерных арилацетонитрилов с целью получения новых биологически активных аминоизохинолинов [31].

А.В. Середа показал, что ДМФАН с HCl в присутствии кислот Льюиса, например хлорида цинка, образует лишь димерный аддукт структуры $3,4-(\text{MeO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{CNH}\cdot\text{ZnCl}_3\cdot 3,4-(\text{MeO})_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2\text{C}(\text{Cl})=\text{NH}_2\cdot\text{ZnCl}_3$, который при мягком гидролизе превращается в исходный нитрил и соответствующий амид [2, 32]. На рис. 4 приведена компьютерная модель указанного ассоциата, на которой видно, что активные группы ДМФАН и его нитрилиевой соли блокированы молекулами хлорида цинка, препятствуя тем самым реакции циклоконденсации.

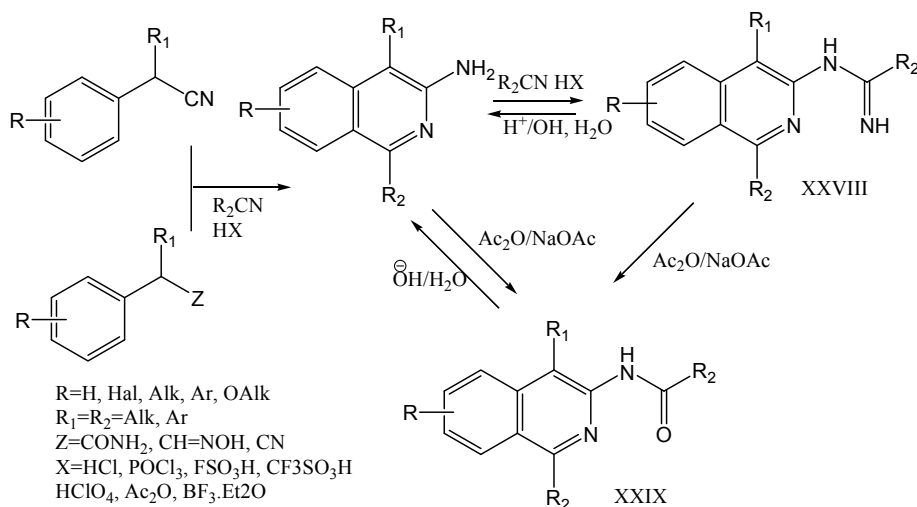
При разработке схем синтеза бензо[с]фенантридинов с потенциальным противоопухолевым и антимикробным действием с применением нитрилов была выявлена роль енаминовой таутомерии. На примере арилацетимидоил-арилацетонитрила (XXIV) показано, что Z-циано-енамин (Z-XXIV) циклизуется в amino-пиримидин (XXVI), а его E-енаминовый таутомер (E-XXIV), напротив, образует гидролизующиеся на воздухе олигомеры [26]. При получении исходных нитрилов нами был найден новый способ синтеза 2,3-замещенного индола (XXVII) из XXIV ($R = \text{Br}$) по реакции Ульмана, что является новым подходом в химии этой гетероциклической системы [33 – 36]:



N-Ацилированием оснований XX, XXI, а также XXVIII получены разнообразные 3-(N-ацетиламино)изохинолины (XXIX) [25–27] для физико-химических, аналитических и биологических исследований. Изучена масс-спектрометрическая фрагментация XXa [37]. На основе XXa был разработан гаптен, использованный в получении

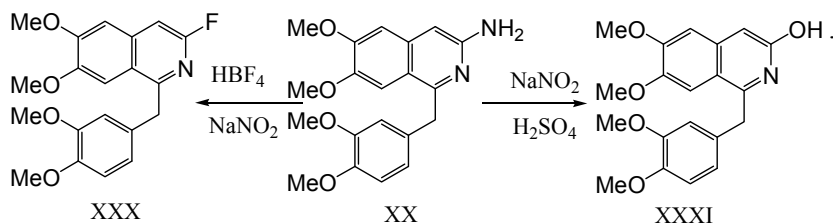
твердофазной иммунотест-системы для обнаружения папаверина в биологических жидкостях и в культуральных средах [38].

Таким образом, можно представить общую, упрощенную, без учета побочных реакций, схему превращения арилацетонитрилов в 3-аминоизохинолин и его производные:



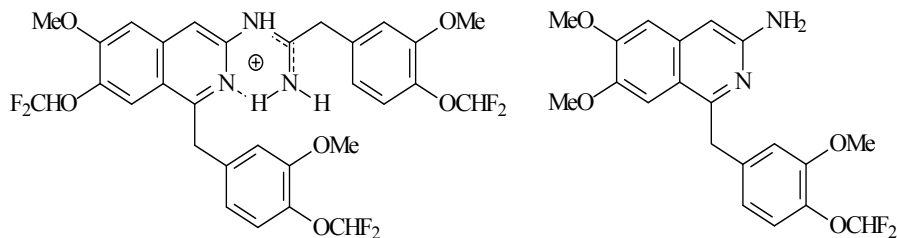
Диазотированием XXa в присутствии HBF₄ бавленной серной кислоты – 3-оксипапаверин (XXXI) [2]:

получен 3-фторпапаверин (XXX), а в среде раз-



Из 4-дифторметокси-3-метоксифенилацетонитрила методом КЦК синтезированы дифторметокси-аналоги 3-имидаминопапаверина

(XXXII), 3-аминопиперазина (XXXIII) и ряд функционально замещенных производных [39]:



В условиях восстановительного метилирования методом Эшвайлера–Кларка ($\text{CH}_2\text{O} + \text{HCOOH}$) происходит конденсация двух молекул аминоксизохинолинов с образованием изохинолин-содержащих аналогов соединения Трегера структуры (XXXIVa, R = Me; XXXIVb, R = 3,4-(MeO) $_2$ C $_6$ H $_3$ CH $_2$ -) [2, 40]:

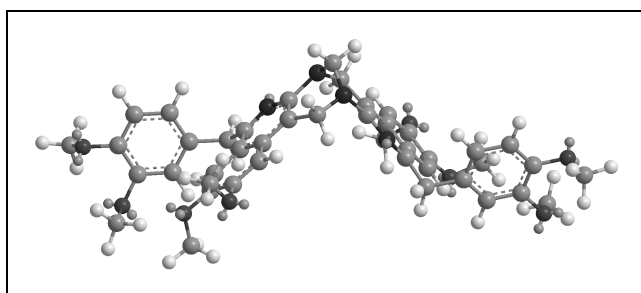
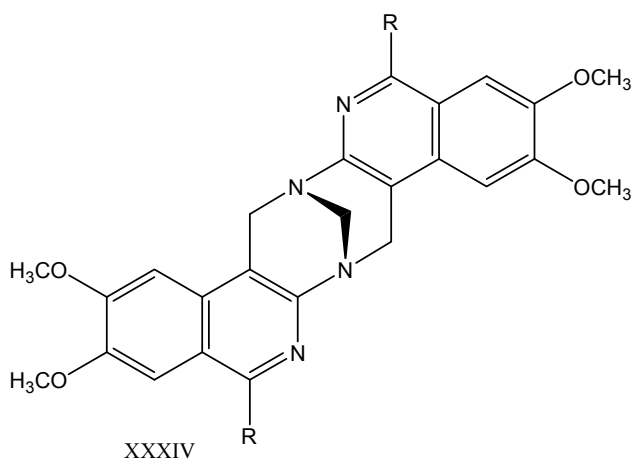


Рис. 5. Молекулярная модель бис-аминопиперазинового аналога соединения Трегера (XXXIVb) ($\Sigma E = 29,68$ ккал/моль)

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 3-АМИНОИЗОХИНОЛИНОВ

В процессе биологического скрининга 3-аминоизохинолинов была выявлена спазмолитическая активность у XX и его производных [41, 42], а у 3-(N-бензоиламино)-1-метил-3,4-диметокси-

изохинолинов – умеренная цитостатическая активность [43–46]. Некоторые 3-аминоизохинолины обладают антипсихотической активностью (нейролептики) [47–48], являются антидепрессантами [19, 49]. Среди них были также найдены ингибиторы факторов свертываемости крови [50–52]. Ряд производных 3-аминоизохинолинов показали антималярийную активность [53–55], а также влияние на β -клетки поджелудочной железы [56]. Повышение интереса специалистов в последние годы к 3-аминоизохинолинам свидетельствует о перспективности дальнейших разработок в этой области. Например, соединение структуры VIIIb было предложено также использовать в качестве колориметрического сенсора в аналитической химии [57].

ВЫВОДЫ

1. Обобщены методы простого и эффективного пути синтеза 3-аминоизохинолинов в мягких условиях с использованием кислотокатализируемой реакции циклоконденсации арилацетонитрилов, получения их функциональных производных, в том числе природных аналогов алкалоидов (например, 3-аминопиперазина), разработанные ФГБНУ ВИЛАР.
2. Рассмотрены механизмы превращений в процессе синтеза.
3. Предложен твердофазный метод определения папаверина в биологических жидкостях и клеточных культурах на основе пептидных производных 3-аминопиперазина.
4. Приведено краткое освещение некоторых собственных и литературных данных биологической активности синтезированных соединений.
5. Показана перспективность получения производных 3-аминопиперазина и их использования в качестве биологически активных агентов в медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лана Г.Б., Толкачев О.Н. Изохинолиновые алкалоиды // Труды ВИЛАР. Химия, технология, медицина. 2003. Т. XVI. М. С. 16–24.
2. Середя А.В. Новый способ получения замещенных изохинолинов на основе кислотокатализируемой циклоконденсации нитрилов: Автореф. дисс. канд. хим. наук. М. 1989. 18 с.
3. Richardson T., Robinson R., Seijo E. Synthetical experiments in the chelidone – sanguinarine group of the alkaloids. Part 1. // J. Chem. Soc. 1937. P. 835–841.
4. Зильберман Е.Н. Реакции нитрилов. М.: Химия. 1972. С. 37–52.
5. Бабичев Ф.С., Шаранин Ю. А., Промоненков В.К., Литвинов В.П., Воловенко Ю.М. Внутримолекулярное взаимодействие нитрильной и аминогрупп / под ред. Ф.С. Бабичева. Киев: Наукова думка. 1987. 240 с.
6. Johnson F., Madronero R. Heterocyclic Syntheses Involving Nitrilium Salts and Nitriles in Acidic Condition // Advances in Heterocyclic Chemistry, Ed. by A.K. Katritzky, A.J. Balton. New York: Academic Press. 1966. V. 6. P. 95–146.
7. Бюлер К., Пирсон Д. Органические синтезы. Ч. 2. М.: Мир. 1973. С. 413.
8. Johnson F., Nasutavicus W.A. The Cyclisation of Dinitriles by Anhydrous Halogen Acids // J. Org. Chem. 1962. V. 27(11). P. 3953–3958.
9. Johnson F., Nasutavicus W.A. Polyfunctional Aliphatic Compounds. IV. The Cyclization of Nitriles by Hydrogen Acids // A New Synthesis of Thiazoles. J. Org. Chem. 1963. V. 28(7). P. 1877–1883.
10. Johnson F. Amino-halo Isoquinolines: US Pat. 3277096, 04.10.1966; Chem. Abstr. 66. 28682 k (1967).
11. Sanders G.M., van Dijk M., den Hertog H.J. Ring fissions during reactions of aminoisoquinolines with potassium amide in liquid ammonia. (1). Formation of 1-cyanoisoindole from 3-amino-4-bromoisoquinoline // Tetrahedron Lett. 1972. № 46. P. 4717–4718.
12. Ainscough M.A., Temple A.F. Novel Synthesis of Isoquinolin-3-ols // J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1976. № 17. P. 695–696.
13. Sommer M. B., Begtrup M., Bogeso K. P. Displacement of Halogen of 2-Halogeno-Substituted Benzimidazoles with Carbanions. Preparation of (2-Cyanoaryl)arylacetonitriles // J. Org. Chem. 1990. V. 55(16). P. 4812–4827.
14. Liepa A.J. A Synthesis of Alkylated 3-Aminoisoquinolines // Austr. J. Chem. 1982. V. 35(7). P. 1391–1403.
15. Garcia A., Lete E., Villa M.J., Dominguez E., Badia M.D. // A Simple Direct Approach to 1-Substituted 3-Arylisoquinolines from Deoxybenzoin and Nitriles // Tetrahedron. 1988. V. 44(21). P. 6681–6686.
16. Elnagdi M. H., Elmognayar M. R. H., Elgemeil G. E. H. The Chemistry of 3-Oxoalkanonitriles // Synthesis. 1984. № 1. P. 1–26.
17. Cupps T.L., Wise D.S., Townsed L.B. Synthetic strategies for 2,4-dimethoxy-pyrrolo[3,2-d]pyrimidine // J. Org. Chem. 1983. V. 48(7). P. 1060–1064.
18. Barnard I. F., Elvidge J. A. Heterocyclic Imines and Amines. Part 18. Conversion of o-Cyanobenzyl Cyanide into Isoquinoline, Benzylisoquinoline, and Azachrysenes Products // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1989. № 6. P. 1137–1140.
19. Neumeier J.L., Weinhardt K.K., Carrano R.A., McCurdy D.H., Little A.D. Isoquinolines. 3. 3-Aminoisoquinoline derivatives with central nervous system depressant activity // J. Med. Chem. 1973. V. 16. P. 808–813.
20. Бровченко В.Г., Шабаева Н.В., Пыцев А.И., Кузнецов Е.В. Синтез диоксилина и других 6,7-диметоксиизохинолинов в условиях модифицированной реакции Риттера // Химия гетероциклических соединений. 1992. № 3. С. 363–368.
21. Booth B.L., Collins A. One-step Synthesis of N-(1-Benzylisoquinolin-3-yl)phenylacetamidinium trifluoromethanesulfonate derivatives from phenylacetone nitriles and trifluoromethanesulfonic acid // J. Chem. Res. 1989. P. 305–312.
22. Takeda K., Ohta T., Shudo K., Okamoto T., Tsuji K., Kosuge T. Synthesis of a Mutagenic Principle Isolated from *Trypophane Pyrolysate* // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 1977. V. 25(8). P. 2145–2146.
23. Al-Omran F., ElKhair A.A., Elnagdi M.H. Studies with polyfunctionally substituted heteroaromatics: A novel synthesis of substituted 4,8-diaminoisoquinolines as potential antiparasitic agent // J. Chem. Res. 1998. № 5. P. 798–799.
24. А.с. №1540231 (СССР). 01.10.1989, приор 18.12.1987. Способ синтеза производных 3-аминоизохинолина / А.В. Середя, О.Н. Толкачев, Б.М. Золотарев, И.В. Ярцева.
25. Sereda A.V., Sukhov I.E., Zolotarev B.M., Yartzeva I.V., Tolkahev O.N. Acid Promoted Cyclocondensation of Nitriles. I. Novel Synthesis of 3-Aminoisoquinolines and Their Derivatives // Tetrah. Letters. 1992. V. 33(29). P. 4205–4208.
26. Sereda A.V., Sukhov I.E., Lapa G.B., Tolkahev O.N. Acid promoted cyclocondensation of arylacetone nitriles // The Xth International conference on organic synthesis (ICOS-10), Dec. 11 – 16, 1994, Bangalore, India. Abstract P-WED-99, P. 179.
27. Середя А.В., Толкачев О.Н. Новые биологически активные производные папаверина. Перспективы создания и производства лекарственных средств в Украине // Тезисы докладов науч.-практич. конф. (4 – 8 октября 1993). Одесса, Харьков. 1993, Минздрав Украины. С. 119–120.
28. Лана Г.Б., Толкачев О.Н. Вивчення нитрильної конденсації арилацетонитрилів // VII Українська конференція з органічної хімії. Харків. 3–6 жовтня 1995. Тези доповідей. Частина 1. С. 222.
29. Середя А.В., Сухов И.Е., Лана Г.Б., Золотарев Б.М., Ярцева И.В., Толкачев О.Н. Кислотокатализируемая циклоконденсация нитрилов. II. Новый синтез 3-аминоизохинолинов, 3-имидоламиноизохинолинов и производных 3-имино-2-азаспиро[4,5]дека-6,9-диен-8-она // Журнал органической химии. 1994. V. 30. № 12. P. 1782–1790.
30. Сухов И.Е., Толкачев В.О., Толкачев О.Н. Региоселективность реакции аминотилирования замещенных фенолов // Химия, технология, медицина, Труды ВИЛАР. 2003. Т. XVI. Москва. С. 99–106.
31. Лана Г.Б., Толкачев В.О., Толкачев О.Н. Синтез бісціанометилдифенілових ефірів // XVII Українська конференція з органічної хімії, Харків. 3 – 6.10. 1995. Тези доповідей. Ч. 1. С. 223
32. Середя А.В. Изучение взаимодействия гомовератронитрила с кислотами Льюиса // Труды VIII конф. молодых ученых ВНИИ лекарственных растений (Москва. Март 1987). М.: ВНИИ лекарственных растений. 1988. С. 173–175.
33. Лана Г.Б., Шейченко В.И., Толкачев О.Н. Поиск новых подходов к синтезу бензо[с]фенантридиновых алкалоидов // Труды ВИЛАР. Химия, технология, медицина. М. 2000. С. 22–26.

34. Lapa G.B., Tolkachev O.N. Application of nitrilic condensation for the synthesis of substituted indoles // 11th International Conference on Organic Synthesis, June 30 – July 4. 1996. Amsterdam. Netherlands. Book of Abstracts. PO-021. P. 157.
35. Tolkachev V.N., Skurydina D.F., Nikolaeva T.C., Sereda A.V., Sukhov I.E., Lapa G.B., Tolkachev O.N., Sokolov S.Ya. Structure-antitumor activity study of polyoxygenated indoles and isoquinolines // XVI International cancer congress, New Delhi. India, 30 Oct. – 5 Nov. 1994. Abstract Book 1. PSB 11–15. P. 303.
36. Lapa G.B., Tolkachev O.N. A novel approach to the synthesis of substituted indoles via nitrilic condensation // Third International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC – 3). Sept. 1 – 30. 1999.
37. Серета А.В., Сухов И.Е., Толкачев В.О., Золотарев Б.М., Толкачев О.Н. Масс-спектрометрическая фрагментация замещенных 3-имидамоламиноизохинолинов // Химия, технология, медицина. Труды ВИЛАР. 2003. Т. XVI. М. С. 84–89.
38. Еременко С.Н., Сухов И.Е., Данилова Н.П., Толкачев О.Н., Василов Р.Г., Мирошников А.И. Твердофазный иммуноферментный метод определения папаверина // Химико-фармацевтический журнал. 1992. Т. 26. № 11–12. С. 100–101.
39. Серета О.В., Фіалков Ю.А., Ловинський М.О. Реакція циклотримеризації 4-диформетокси-3-метоксibenзіліаніду // XVII Українська конференція з органічної хімії, Тези доповідей, Ч. 1. Харків, Україна. 1995. С. 190.
40. Sereda A.V., Tolkachev O.N. Synthesis of new Troeger bases from 3-aminoisoquinolines // 15th International Congress of Heterocyclic Chemistry. Taipei. 1995. August 6 – 11. 1995. Abstracts. PO2-210.
41. Серета А.В., Лана Г.Б., Сухов И.Е., Белова Л.Ф., Соколов С.Я., Мирошников А.И., Толкачев О.Н. Кислотокатализируемая циклоконденсация нитрилов. IV. Синтез и спазмолитическая активность 1-замещенных 3-аминоизохинолинов // Химико-фармацевтический журнал. 1997. Т. 31. № 4. С. 22–27.
42. А.с. № 1616083. Производные 3-амино-6,7-диметоксиизохинолина, обладающие спазмолитической активностью / А.В. Серета, С.Я. Соколов, Л.Ф. Белова, О.Н. Толкачев. 22.08.90, приоритет 18.12.87
43. Лана Г.Б., Толкачев В.О., Иванова Т.П., Толкачев О.Н. Кислотокатализируемая циклоконденсация нитрилов. III. Синтез замещенных 3-аминоизохинолинов и их цитотоксическая активность // Химико-фармацевтический журнал. 1996. Т. 30. № 1. С. 16–18.
44. Лана Г.Б. Исследование путей синтеза изохинолиновых алкалоидов и бисиндольных оснований катарантуса розового, обладающих цитостатической активностью: Автореф. дисс. ... канд. хим. наук. М. 1995. 21 с.
45. Евсеев Г.Г., Барышникова М.А., Лана Г.Б. Синтез новых амидов 1-метил-3-амино-изохинолина, их цитотоксическая активности и поиск их молекулярных мишеней *in silico* и *in vitro* (краткое сообщение) // Российский биотерапевтический журнал. 2015. № 1. С. 80.
46. Лана Г.Б., Барышникова М.А., Вартамян А.А., Сергеев Д.В., Чигорина Е.А. Синтез новых 3-аминоизохинолинов и их первичный скрининг на цитотоксичность, ингибирование миграции клеток и васкулогенной мимикрии (краткое сообщение) // Российский биотерапевтический журнал. 2014. Т. 13. № 1, С. 104–104.
47. Hock F.J., Kruse H.J., Gerhards H.J., Konz E. Pharmacological Effects of HR 375: a new potential antipsychotic agent. // Drug Dev. Res. 1985. V. 6. № 4. P. 301–311.
48. Su T. HR 375: a potential antipsychotic drug that interacts with d2 receptors and – receptors in the brain // Neurosci. Lett. 1986. V. 71. № 2. P. 224–228.
49. Beyhl F.E., Kruse H.J., Hock F.J. Interaction of central acting compounds with hepatic drug-metabolizing enzyme systems. effects of two antidepressants with isoquinoline structure on liver microsomal enzymes // IRSC Med. Sci. 1986. V. 14. № 3. P. 258–259.
50. Sinha U., Lin P.H., Edwards S.T., Wong P.W., Zhu B., Scarborough R.M., Su T., Jia Z.J., Song Y., Zhang P., Clizbe L., Park G., Reed A., Hollenbach S.J., Malinowski J., Arfsten A.E. Inhibition of purified factor xa amidolytic activity may not be predictive of inhibition of *in vivo* thrombosis: implications for identification of therapeutically active inhibitors // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2003. V. 23. № 6. P. 1098–1104.
51. Zhang P., Zuckett J.F., Woolfrey J., Tran K., Huang B., Wong P., Sinha U., Park G., Reed A., Malinowski J., Hollenbach S., Scarborough R.M., Zhu B.Y. Design, synthesis, and SAR of monobenzamidines and aminoisoquinolines as factor Xa inhibitors // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002. V. 12. № 12. P. 1657–1661.
52. Choi-Sledeski Y.M., Becker M.R., Green D.M., Davis R., Ewing W.R., Mason H.J., Ly C., Spada A., Liang G., Cheney D., Barton J., Chu V., Brown K., Colussi D., Bentley R., Leadley R., Dunwiddie C., Pauls H.W. Aminoisoquinolines: design and synthesis of an orally active benzamidine isostere for the inhibition of factor XA // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999. V. 9. № 17. P. 2539–2544.
53. Neumeyer J.L., Weinhardt K.K. Isoquinolines. 1. 3-Amino- and 3-fluoroisoquinoline derivatives as potential antimalarials // J. Med. Chem. 1970. V. 13. № 4. P. 613–616.
54. Neumeyer J.L., Weinhardt K.K. Isoquinolines. 2. 3-(Dialkylamino)isoquinolines as potential antimalarial drugs // J. Med. Chem. 1970. V. 13. № 5. P. 999–1002.
55. Enwonwu C.O., Afolabi B.M., Salako L.O., Idigbe E.O., Bashirelah N. Increased plasma levels of histidine and histamine in falciparum malaria: relevance to severity of infection // J. Neural Transm. 2000. V. 107. № 11. P. 1273–1287.
56. Kast A., Ueberg H. Cytoplasmic vacuolation of pancreatic β -cells of rats after oral administration of a derivative of isoquinoline // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1986. V. 85. № 2. P. 274–285.
57. Wan Y., Niu W., Behof W. J., Wang Y., Boyle P., Gorman Ch. B. Aminoisoquinolines as colorimetric Hg₂ sensors: the importance of molecular structure and sacrificial base // Tetrahedron. 2009. V. 65. P. 4293–4297.

Поступила 20 июля 2015 г.

APPLICATION OF THE ACID PROMOTED CYCLIZATION OF NITRILES FOR THE SYNTHESIS OF 3-AMINOISOQUINOLINES (REVIEW)

© G.B. Lapa, O.N. Tolkachev, 2016

G.B. Lapa

Ph.D. (Chem.), Senior Research Scientist, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center (Moscow)
E-mail: lapa_g@mail.ru

O.N. Tolkachev

Dr.Sc. (Chem.), Professor, All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: vilarnii@mail.ru

Review on the simple and efficient method of 3-aminoisoquinolines synthesis using acid promoted cyclocondensation of nitriles and production of their functionally substituted derivatives is presented. Their reaction mechanisms and dynamic of the reaction process are discussed. Naturally occurring alkaloids analogues e.g. 3-aminopapaverine are produced and studied. Solid phase determination of papaverine in biological liquids and in the cell cultures is worked out. Spectral characteristics of 3-aminoisoquinolines, results of their biological activities and the prospects of their use in medicine are also discussed.

Key words: 3-aminoisoquinolines, synthesis, transformations, reactions mechanisms, biological activities.

References

- Lapa G.B., Tolkachev O.N. Izohinolinovye alkaloidy // Trudy VILAR. Himija, tehnologija, medicina. 2003. T. XVI. Moskva. S. 16–24.
- Sereda A.V. Novyj sposob poluchenija zameshennyh izohinolinov na osnove kislotokataliziruemoj ciklokondensacii nitrilov: Avtoref. diss. kand. him. nauk. M. 1989. 18 s.
- Richardson T., Robinson R., Seijo E. Synthetical experiments in the chelidonine – sanguinarine group of the alkaloids. Part 1. // J. Chem. Soc. 1937. P. 835–841.
- Zil'berman E.N. Reakcii nitrilov. M.: Himija. 1972. S. 37–52.
- Babichev F.S., Sharanin Ju. A., Promonenkov V.K., Litvinov V.P., Volovenko Ju.M. Vnutrimolekuljarnoe vzaimodejstvie nitril'noj i aminogrupp / pod red. F.S. Babicheva. Kiev: Naukova dumka. 1987. 240 s.
- Johnson F., Madronero R. Heterocyclic Syntheses Involving Nitrilium Salts and Nitriles in Acidic Condition // Advances in Heterocyclic Chemistry, Ed. by A.K. Katritzky, A.J. Balton. New York: Academic Press. 1966. V. 6. P. 95–146.
- Bjuler K., Pirson D. Organicheskie sintezy. Ch. 2. M.: Mir. 1973. C. 413.
- Johnson F., Nasutavicus W.A. The Cyclisation of Dinitriles by Anhydrous Halogen Acids // J. Org. Chem. 1962. V. 27(11). P. 3953–3958.
- Johnson F., Nasutavicus W.A. Polyfunctional Aliphatic Compounds. IV. The Cyclization of Nitriles by Hydrogen Acids // A New Synthesis of Thiazoles. J. Org. Chem. 1963. V. 28(7). P. 1877–1883.
- Johnson F. Amino-halo Isoquinolines: US Pat. 3277096, 04.10.1966; Chem. Abstr. 66. 28682 k (1967).
- Sanders G.M., van Dijk M., den Hertog H.J. Ring fissions during reactions of aminoisoquinolines with potassium amide in liquid ammonia. (1). Formation of 1-cyanoisindole from 3-amino-4-bromoisoquinoline // Tetrahedron Lett. 1972. № 46. P. 4717–4718.
- Ainscough M. A., Temple A.F. Novel Synthesis of Isoquinolin-3-ols // J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1976. № 17. P. 695–696.
- Sommer M. B., Begtrup M., Bogeso K. P. Displacement of Halogen of 2-Halogeno-Substituted Bonezonitriles with Carbanions. Preparation of (2-Cyanoaryl)arylacetonitriles // J. Org. Chem. 1990. V. 55(16). P. 4812–4827.
- Liepa A. J. A Synthesis of Alkylated 3-Aminoisoquinolines // Austr. J. Chem. 1982. V. 35(7). P. 1391–1403.
- Garcia A., Lete E., Villa M.J., Dominguez E., Badia M.D. // A Simple Direct Approach to 1-Substituted 3-Aryloisoquinolines from Deoxybenzoins and Nitriles // Tetrahedron. 1988. V. 44(21). P. 6681–6686.
- Elnagdi M. H., Elmognayar M. R. H., Elgemeil G. E. H. The Chemistry of 3-Oxoalkanonitriles // Synthesis. 1984. № 1. P. 1–26.
- Cupps T.L., Wise D.S., Townsed L.B. Synthetic strategies for 2,4-dimethoxypyrrrolo[3,2-d]pyrimidine // J. Org. Chem. 1983. V. 48(7). P. 1060–1064.
- Barnard I. F., Elvidge J. A. Heterocyclic Imines and Amines. Part 18. Conversion of o-Cyanobenzyl Cyanide into Isoquinoline, Benzylisoquinoline, and Azachrysenes Products // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 1989. № 6. P. 1137–1140.
- Neumeyer J.L., Weinhardt K.K., Carrano R.A., McCurdy D.H., Little A.D. Isoquinolines. 3. 3-Aminoisoquinoline derivatives with central nervous system depressant activity // J. Med. Chem. 1973. V. 16. P. 808–813.
- Brovchenko V.G., Shabaeva N.V., Pyshev A.I., Kuznecov E.V. Sintez dioksilina i drugih 6,7-dimetoksiizohinolinov v uslovijah modifirovannoj reakcii Rittera // Himija geterociklicheskih soedinenij. 1992. № 3. C. 363–368.
- Booth B.L., Collins A. One-step Synthesis of N-(1-Benzylisoquinolin-3-yl)phenylacetamidinium trifluoromethanesulfonate derivatives from phenylacetone nitriles and trifluoromethanesulfonic acid // J. Chem. Res. 1989. P. 305–312.
- Takeda K., Ohta T., Shudo K., Okamoto T., Tsuji K., Kosuge T. Synthesis of a Mutagenic Principle Isolated from Tryptophane Pyrolysate // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 1977. V. 25(8). P. 2145–2146.
- Al-Omran F., ElKhair A.A., Elnagdi M.H. Studies with polyfunctionally substituted heteroaromatics: A novel synthesis of substituted 4,8-diaminoisoquinolines as potential antiparasitic agent // J. Chem. Res. 1998. № 5. P. 798–799.
- A.s. № 1540231 (SSSR). Sposob sinteza proizvodnyh 3-aminoizohinolina / A.V. Sereda, O.N. Tolkachev, B.M. Zolotarev, I.V. Jarceva. 01.10.1989, prior 18.12.1987, 10 s.
- Sereda A.V., Sukhov I.E., Zolotarev B.M., Yartzeva I.V., Tolkachev O.N. Acid Promoted Cyclocondensation of Nitriles. I. Novel Synthesis of 3-Aminoisoquinolines and Their Derivatives // Tetrah. Letters. 1992. V. 33(29). P. 4205–4208.
- Sereda A.V., Sukhov I.E., Lapa G.B., Tolkachev O.N. Acid promoted cyclocondensation of arylacetone nitriles // The Xth International conference on organic synthesis (ICOS-10), Dec. 11 – 16, 1994, Bangalore, India. Abstract P-WED-99, P. 179.
- Sereda A.V., Tolkachev O.N. Novye biologicheski aktivnye proizvodnye papaverina. Perspektivy sozdaniya i proizvodstva lekarstvennyh sredstv v Ukraine // Tezisy dokladov nauch.-praktich. konf. (4 – 8 oktjabrja 1993). Odessa, Har'kov. 1993, Minzdrav Ukrainy. S. 119–120.

28. Lapa G.B., Tolkachov O.N. Vivchennja nitril'noi kondensacii arilacetonnitriliv // VII Ukrain'ska konferencija z organichnoi himii. Har'kiv. 3-6 zhovtnja 1995. Tezi dopovidej. Chastina 1. S. 222.
29. Sereda A.V., Suhov I.E., Lapa G.B., Zolotarev B.M., Jarceva I.V., Tolkachev O.N. Kislotokataliziruemaja ciklokondensacija nitrilov. II. Novyj sintez 3-aminoi-zohinolinov, 3-imidoilaminoizohinolinov i proizvodnyh 3-imino-2-azaspiro[4,5]deka-6,9-dien-8-ona // Zhurnal organicheskoi himii. 1994. V. 30. № 12. P. 1782-1790.
30. Suhov I.E., Tolkachev V.O., Tolkachev O.N. Regioselektivnost' reakcii aminometilirovanija zameshennyh fenolov // Himija, tehnologija, medicina, Trudy VILAR. 2003. T. XVI. Moskva. S. 99-106.
31. Lapa G.B., Tolkachov V.O., Tolkachov O.N. Sintez biscianometildifenilovyh jefiriv // XVII Ukrain'ska konferencija z organichnoi himii, Har'kiv. 3 - 6.10. 1995. Tezi dopovidej. Ch. 1. S. 223
32. Sereda A.V. Izuchenie vzaimodejstvija gomoveratritrila s kislotami L'juisa // Trudy VIII konf. molodyh uchenyh VNII lekarstvennyh rastenij (Moskva. Mart 1987) M.: VNII lekarstvennyh rastenij. 1988. C. 173-175.
33. Lapa G.B., Shejchenko V.I., Tolkachev O.N. Poisk novyh podhodov k sintezu benzo[c]fenantridinovyh alkaloidov // Trudy VILAR. Himija, tehnologija, medicina. M. 2000. S. 22-26.
34. Lapa G.B., Tolkachev O.N. Application of nitrilic condensation for the synthesis of substituted indoles // 11th International Conference on Organic Synthesis, June 30 - July 4. 1996. Amsterdam. Netherlands. Book of Abstracts. PO-021. P. 157.
35. Tolkachev V.N., Skurydina D.F., Nikolaeva T.C., Sereda A.V., Sukhov I.E., Lapa G.B., Tolkachev O.N., Sokolov S.Ya. Structure-antitumor activity study of polyoxygenated indoles and isoquinolines // XVI International cancer congress, New Delhi. India, 30 Oct. - 5 Nov. 1994. Abstract Book 1. PSB 11-15. P. 303.
36. Lapa G.B., Tolkachev O.N. A Novel Approach to the Synthesis of Substituted Indoles via Nitrilic Condensation // Third International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC - 3). Sept. 1 - 30. 1999.
37. Sereda A.V., Suhov I.E., Tolkachev V.O., Zolotarev B.M., Tolkachev O.N. Mass-spektrmetricheskaja fragmentacija zameshennyh 3-imidoilaminoizohinolinov // Himija, tehnologija, medicina. Trudy VILAR. 2003. T. XVI. M. S. 84-89.
38. Eremenko S.N., Suhov I.E., Danilova N.P., Tolkachev O.N., Vasilov R.G., Miroshnikov A.I. Tverdogaznyj immunofermentnyj metod opredelenija papaverina // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 1992. T. 26. № 11□12. S. 100-101.
39. Sereda O.V., Fialkov Ju.A., Lovins'kij M.O. Reakcija ciklotrimerizacii 4-diformetoksi-3-metoksiben-zilcianidu // XVII Ukrain'ska konferencija z organichnoi himii, Tezi dopovidej, Ch. 1. Har'kiv, Ukraïna. 1995. C. 190.
40. Sereda A.V., Tolkachev O.N. Synthesis of new Troeger bases from 3-aminoisoquinolines // 15th International Congress of Heterocyclic Chemistry. Taipei. 1995. August 6 - 11. 1995. Abstracts. PO2-210.
41. Sereda A.V., Lapa G.B., Suhov I.E., Belova L.F., Sokolov S.Ja., Miroshnikov A.I., Tolkachev O.N. Kislotokataliziruemaja ciklokondensacija nitrilov. IV. Sintez i spazmoliticheskaja aktivnost' 1-zameshennyh 3-aminoizohinolinov, // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 1997. T. 31. № 4. S. 22-27.
42. A.s. № 1616083. Proizvodnye 3-amino-6,7-dimetoksiizohinolina, obladajushhie spazmoliticheskoi aktivnost'ju / A.V. Sereda, S.Ja. Sokolov, L.F. Belova, O.N. Tolkachev. 22.08.90, prioritet 18.12.87.
43. Lapa G.B., Tolkachev V.O., Ivanova T.P., Tolkachev O.N. Kislotokataliziruemaja ciklokondensacija nitrilov. III. Sintez zameshennyh 3-aminoizohinolinov i ih citotoksicheskaja aktivnost' // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 1996. T. 30. № 1. S. 16-18.
44. Lapa G.B. Issledovanie putej sinteza izohinolinovyh alkaloidov i bisindol'nyh osnovanij katarantusa rozovogo, obladajushhih citostaticeskoi aktivnost'ju: Avtoref. diss. ... kand. him. nauk. M. 1995. 21 s.
45. Evseev G.G., Baryshnikova M.A., Lapa G.B. Sintez novyh amidov 1-metil-3-amino-izohinolina, ih citotoksicheskaja aktivnosti i poisk ih molekuljarnyh mishenej in silico i in vitro (kratkoe soobshhenie) // Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal. 2015. № 1. C. 80.
46. Lapa G.B., Baryshnikova M.A., Vartanjan A.A., Sergeev D.V., Chigorina E.A. Sintez novyh 3-aminoizohinolinov i ih pervichnyj skringing na citotoksichnost', ingibirovanie migracii kletok i vaskulogennoj mimikrii (kratkoe soobshhenie) // Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal. 2014. T. 13. № 1, C. 104-104.
47. Hock F.J., Kruse H.J., Gerhards H.J., Konz E. Pharmacological Effects of HR 375: a New Potential Antipsychotic Agent // Drug Dev. Res. 1985. V. 6. № 4. P. 301-311.
48. Su T. HR 375: a Potential Antipsychotic Drug that Interacts with D2 Receptors and - Receptors in the Brain // Neurosci. Lett. 1986. V. 71. № 2. P. 224-228.
49. Beyhl F.E., Kruse H.J., Hock F.J. Interaction of Central Acting Compounds with Hepatic Drug-metabolizing Enzyme Systems. Effects of two Antidepressants with Isoquinoline Structure on Liver Microsomal Enzymes // IRSC Med. Sci. 1986. V. 14. № 3. P. 258-259.
50. Sinha U., Lin P.H., Edwards S.T., Wong P.W., Zhu B., Scarborough R.M., Su T., Jia Z.J., Song Y., Zhang P., Clizbe L., Park G., Reed A., Hollenbach S.J., Malinowski J., Arfsten A.E. Inhibition of Purified Factor Xa Amidolytic Activity May Not be Predictive of Inhibition of in vivo Thrombosis: Implications for Identification of Therapeutically active Inhibitors // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2003. V. 23. № 6. P. 1098-1104.
51. Zhang P., Zuckett J.F., Woolfrey J., Tran K., Huang B., Wong P., Sinha U., Park G., Reed A., Malinowski J., Hollenbach S., Scarborough R.M., Zhu B.Y. Design, Synthesis, and SAR of monobenzamides and aminoisoquinolines as factor Xa inhibitors // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002. V. 12. № 12. P. 1657-1661.
52. Choi-Sledeski Y.M., Becker M.R., Green D.M., Davis R., Ewing W.R., Mason H.J., Ly C., Spada A., Liang G., Cheney D., Barton J., Chu V., Brown K., Colussi D., Bentley R., Leadley R., Dunwiddie C., Pauls H.W. Aminoisoquinolines: design and synthesis of an orally active benzamide isostere for the inhibition of factor XA // Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999. V. 9. № 17. P. 2539-2544.
53. Neumeyer J.L., Weinhardt K.K. Isoquinolines. 1. 3-Amino- and 3-fluoroisoquinoline derivatives as potential antimalarials // J. Med. Chem. 1970. V. 13. № 4. P. 613-616.
54. Neumeyer J.L., Weinhardt K.K. Isoquinolines. 2. 3-(Dialkylamino)isoquinolines as potential antimalarial drugs // J. Med. Chem. 1970. V. 13. № 5. P. 999-1002.
55. Enwonwu C.O., Afolabi B.M., Salako L.O., Idigbe E.O., Bashirelah N. Increased plasma levels of histidine and histamine in falciparum malaria: relevance to severity of infection // J. Neural Transm. 2000. V. 107. № 11. P. 1273-1287.
56. Kast A., Ueberg H. Cytoplasmic Vacuolation of Pancreatic β -Cells of Rats after Oral Administration of a Derivative of Isoquinoline // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1986. V. 85. № 2. P. 274-285.
57. Wan Y., Niu W., Behof W. J., Wang Y., Boyle P., Gorman Ch. B. Aminoisoquinolines as colorimetric Hg₂ sensors: the importance of molecular structure and sacrificial base // Tetrahedron. 2009. V. 65. P. 4293-4297.

МЕТАБОЛИТЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ*

В.А. Куркин

д.фарм.н., профессор, зав кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии,
Самарский государственный медицинский университет
E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

Рассмотрены метаболиты лекарственных растений как биологически активные соединения (БАС), химическая природа которых положена в основу химической классификации лекарственного растительного сырья. Обосновано фундаментальное значение химической классификации лекарственного растительного сырья не только для фармакогнозии, но и для фитотерапии, в случае которой химическая природа БАС должна рассматриваться как методологическая основа в плане объяснения особенностей фармакотерапевтического действия, прогнозирования фармакологических эффектов, научного обоснования технологии получения лекарственных препаратов, а также поиска путей достижения эффективности и безопасности лечения с использованием препаратов на основе растительного сырья. Представлено обсуждение зависимости физических, физико-химических, спектральных и фармакологических свойств от химической природы БАС, используемых в качестве критерия подлинности и качества сырья и фитопрепаратов. Показана целесообразность введения в фармакогнозию нового понятия – ведущей группы БАС, а также необходимость трактовки значимости с точки зрения проявления фармакологических эффектов не одной, а нескольких групп действующих веществ.

Ключевые слова: фармация, фармакогнозия, лекарственные растения, лекарственное растительное сырье, метаболиты, биологически активные соединения, фитопрепараты, стандартизация.

Фармакогнозия, как наука и учебная дисциплина, предметом которой является лекарственное сырье растительного и животного происхождения, является одной из важнейших составляющих, формирующих модель специалиста фармацевтического профиля (провизор, фармацевт). В области фармакогнозии за последние 15–20 лет получены новые данные в плане изучения химического состава лекарственных растений. Этому способствовало то обстоятельство, что данная наука обогатилась современными спектральными и физико-химическими методами [6, 7, 26]. Так, использование ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии позволило исследователям изучить химическое строение целого ряда биологически активных соединений (БАС), а также открыть новые группы природных соединений (флаволигнаны и др.). Внедрение методов тонкослойной хроматографии (ТСХ), газожидкостной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) открыло новые возможности для целей стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) и фитопрепаратов, что нашло отражение в Государственной фармакопее Российской Федерации XIII издания.

В этой связи не случайно, что среди современных тенденций развития фармакогнозии заметное место занимают исследования, посвященные совершенствованию химической классификации ЛРС [6, 28].

Цель работы – концептуальное рассмотрение значимости биологически активных соединений лекарственных растений в решении актуальных проблем фармакогнозии и фармации в целом; обоснование новых подходов к стандартизации ЛРС и фитопрепаратов, содержащих фенольные соединения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования служили фармакопейные растения, лекарственное растительное сырье, биологически активные соединения, выделенные из ЛРС.

Были изучены корневища и биомасса родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), кора сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.), корневища и корни элеутерококка колючего [*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.], семена и плоды лимонника китайского (*Schizandra chinensis* Baill.), трава мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis* L.),

* Статья представлена на Первой научной конференции «Метаболомика биологических объектов» (25–26 ноября 2015 г., Москва).

цветки лаванды колосовой (*Lavandula spica* L.), трава зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.) и зверобоя пятнистого (*Hypericum maculatum* Grantz.), трава эхинацеи пурпурной [*Echinacea purpurea* (L.) Moench.], плоды расторопши пятнистой [*Silybum marianum* (L.) Gaertn.], листья гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.), цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), цветки бессмертника песчаного [*Helichrysum arenarium* (L.) Moench.], почки тополя черного (*Populus nigra* L.), цветки календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.), кора ивы остролистной (*Salix acutifolia* Willd.), листья березы бородавчатой (*Betula verrucosa* Ehrh.), корни солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.), трава гречихи посевной (*Fagopyrum sagittatum* Gilib.), плоды черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus* L.), плоды жостера слабительного (*Rhamnus cathartica* L.), кора крушины ломкой (*Frangula alnus* Mill.), листья кассии остролистной (*Cassia acutifolia* Del.), корни щавеля конского (*Rumex confertus* Willd.), а также фенилпропаноиды, флавоноиды и антраценпроизводные, выделенные из исследуемого ЛРС.

В работе использованы: тонкослойная хроматография, колоночная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, спектрофотометрия, ¹H-ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, различные химические превращения. ¹H-ЯМР-спектры получали на приборах «Gemini-200» (200 МГц), «Bruker AM 300» (300 МГц), масс-спектры снимали на масс-спектрометре «Kratos MS-30», регистрацию УФ-спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» («Analytik Jena»). Воздушно-сухое растительное сырье подвергали исчерпывающему экстрагированию 70%-ным этиловым спиртом. Полученные водно-спиртовые экстракты упаривали под вакуумом до густого остатка и далее подвергали разделению методом колоночной хроматографии (силикагель L 40/100, полиамид «Woelm»), элюируя хлороформом и смесью хлороформ–этиловый спирт в различных соотношениях. Контроль за разделением веществ осуществляли с помощью ТСХ-анализа на пластинках «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» в системах хлороформ–этанол (9:1), хлороформ–этанол–вода (26:16:3), а также *n*-бутанол–ледяная уксусная кислота–вода (4:1:2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате изучения химического состава целого ряда лекарственных растений нами выде-

лены и охарактеризованы с использованием УФ-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, различных химических превращений более 400 веществ, относящихся к фенилпропаноидам, флавоноидам, кумаринам, антрагликозидам, простым фенолам, терпеноидам, алкалоидам, среди которых 35 соединений являются новыми, причем для некоторых из них выявлена биологическая активность [1, 2, 4–16, 18–24, 29]. При этом изучены зависимости физических, физико-химических, спектральных и фармакологических свойств от химической природы биологически активных соединений, используемых в качестве критерия подлинности и качества сырья и фитопрепаратов [5, 7, 19–23, 28, 29].

Для успешного решения фармакогнозии и фармации в целом БАС следует рассматривать с точки зрения:

- диагностики (видовая принадлежность);
 - качественных реакций (определение подлинности сырья);
 - количественного определения содержания уровня БАС;
 - параметров валидации методов фармакопейного анализа;
 - использования государственных стандартных образцов;
 - физико-химических свойств БАС, включая растворимость, возможную термолабильность, светочувствительность);
 - обоснования способа получения субстанции и лекарственной формы;
 - фармакологических свойств БАС и лекарственной формы;
 - соотнесения химического состава лекарственного растительного сырья и фитопрепарата;
 - возможных процессов трансформации БАС в ходе сушки, хранения, переработки лекарственного растительного сырья.
- Результаты изучения химического состава сырья лекарственных растений, а также систематизация литературных данных относительно компонентного состава ЛРС создали предпосылки для создания новых учебников по фармакогнозии [7, 26], в основу которых положена разработанная нами химическая классификация лекарственных растений [6].

Обосновано, что химическая классификация лекарственного растительного сырья имеет не только фундаментальное значение для фармакогнозии, но и актуальна в фармацевтической технологии, фармацевтической химии, фармакологии и

фитотерапии, в случае которых химическая природа БАС должна рассматриваться как методологическая основа в плане объяснения особенностей фармакотерапевтического действия, прогнозирования фармакологических эффектов, научного обоснования технологии получения лекарственных препаратов, а также поиска путей достижения эффективности и безопасности лечения с использованием препаратов на основе растительного сырья. Показана целесообразность введения в фармакогнозию нового понятия – ведущей группы БАС, а также необходимость трактовки значимости с точки зрения проявления фармакологических эффектов не одной, а, как правило, нескольких групп действующих веществ. При этом в качестве ведущей группы БАС предложено рассматривать действующие вещества, наиболее уязвимые с точки зрения физико-химических свойств на всех стадиях технологического процесса (возделывание, заготовка, сушка, переработка, хранение ЛРС и др.). Например, в случае эфиромасличного сырья, эфирные масла, как правило, рассматриваются в качестве ведущей группы БАС из-за их летучести, термолабильности и других свойств.

В настоящее время становится актуальной необходимость трактовки в большинстве видов ЛРС вклада в фармакологическую активность нескольких групп БАС: например, в родиоле розовой – это фенилпропаноиды и простые фенолы, в расторопше пятнистой – флаволигнаны и жирное масло, в мелиссе лекарственной – эфирное масло и фенилпропаноиды, в эхинацее пурпурной – фенилпропаноиды, полисахариды и алкиламины, в пионе уклоняющемся – монотерпеновые гликозиды, простые фенолы и эфирное масло, в зверобое продырявленном – четыре группы действующих веществ: флавоноиды, антраценпроизводные, дубильные вещества и флороглюцины (гиперфорин). Это создает научную основу как с точки зрения объяснения фармакологических эффектов, так и в плане обоснования ресурсосберегающих технологий получения ЛРС, включая комплексную переработку ЛРС. Например, в траве мелиссы лекарственной эфирное масло обуславливает в основном седативное и спазмолитическое действие, а фенилпропаноиды – анксиолитические, иммуномодулирующие, противовирусные, антигистаминные, антимикробные и другие свойства, причем в основном за счет розмариновой кислоты. Такое толкование дает возможность по-новому взглянуть на мелиссу лекарственную в плане трактовки фарма-

кологической группы: сегодня данное растение, являющееся формально седативным, следует рассматривать прежде всего как анксиолитик. Это подтверждают результаты исследований, в соответствии с которыми настойка мелиссы лекарственной по механизму действия близка к таковому диазепаму [19]. Данная трактовка создает перспективу совершенствования стандартизации ЛРС и фитопрепаратов, особенно с точки зрения современной мировой тенденции, предполагающей использование в методиках качественного и количественного анализа определение двух–трех групп БАС, имеющих диагностическое значение.

В рамках современной химической классификации ЛРС [6], которая положена в основу учебника «Фармакогнозия» [7], актуальным является аспект критического пересмотра отнесения некоторых лекарственных растений к какой-либо химической группе действующих веществ. Так, трава зверобоя продырявленного отнесена нами к флавоноидам, по содержанию которых в Российской Федерации осуществляется стандартизация данного сырья, но при этом предложено проводить контроль качества и по содержанию второй группы действующих веществ – антраценпроизводным, к которым ранее относилось данное растение.

Критически пересмотрено отнесение корневищ родиолы розовой, в которой на момент введения в научную медицину в качестве действующих веществ были известны лишь простые фенолы. В ходе углубленного изучения химического состава корневищ родиолы розовой было установлено, что действующими веществами сырья данного растения являются также фенилпропаноиды, которые имеют диагностическое значение. Это стало основанием для пересмотра химической классификации, а также обоснования новых подходов к стандартизации корневищ родиолы розовой и препаратов на основе данного сырья, заключающихся в определении доминирующего фенилпропаноида – розавина [1, 5, 9, 30]. Была обоснована также целесообразность отнесения к иридоидам травы пустырника, которая ранее рассматривалась в рамках флавоноидов.

В фармакогнозию нами введены такие группы БАС, как фенилпропаноиды, ксантоны, хиноны, иридоиды, монотерпеновые гликозиды, экдистероиды, ферменты. Отнесение к фенилпропаноидам таких растений, как родиола розовая (золотой корень), элеутерококк колючий, лимонник китайский, эхинацея пурпурная, сирень обыкновенная, расторопша пятнистая позволяет не

только обосновывать подходы к стандартизации сырья вышеперечисленных растений [5, 8–10, 14–20, 27], но и прогнозировать для препаратов на их основе иммуномодулирующее действие, осуществлять целенаправленный поиск новых растений, влияющих на иммунную систему, а также обладающих адаптогенными, анксиолитическими, ноотропными, антидепрессантными, гепатопротекторными и антиоксидантными свойствами [2, 11–15, 17–20, 28].

В настоящее время особую значимость приобретают фенольные соединения лекарственных растений, которые являются ценным источником адаптогенных, тонизирующих, ноотропных, антидепрессантных, анксиолитических, седативных, иммуномодулирующих, гепатопротекторных, желчегонных, антиоксидантных, противовирусных, антимикробных, противовоспалительных и слабительных лекарственных средств [1, 2–5, 9–16, 19–30]. В группе фенольных веществ наиболее распространенными являются фенолпропаноиды, флавоноиды и антрацен-

производные, которые в силу большого структурного разнообразия обладают широким спектром биологической активности [3, 11–30].

При этом следует отметить, что на основе изучения физико-химических, спектральных и фармакологических свойств ранее была разработана современная классификация фенольных веществ, а также обоснована необходимость введения в фармакогнозию фенолпропаноидов как самостоятельного класса БАС [5, 7, 28], что нашло отражение в учебнике «Фармакогнозия» [7]. В настоящее время одной из нерешенных в полной мере проблем является стандартизация ЛРС и фитопрепаратов, содержащих фенольные соединения, в том числе в плане гармонизации методических и методологических подходов к анализу.

В результате изучения химического состава целого ряда лекарственных растений выделены и охарактеризованы (с использованием УФ-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, ТСХ и ВЭЖХ) фенолпропаноиды (1–8), флавоноиды (9–20) и

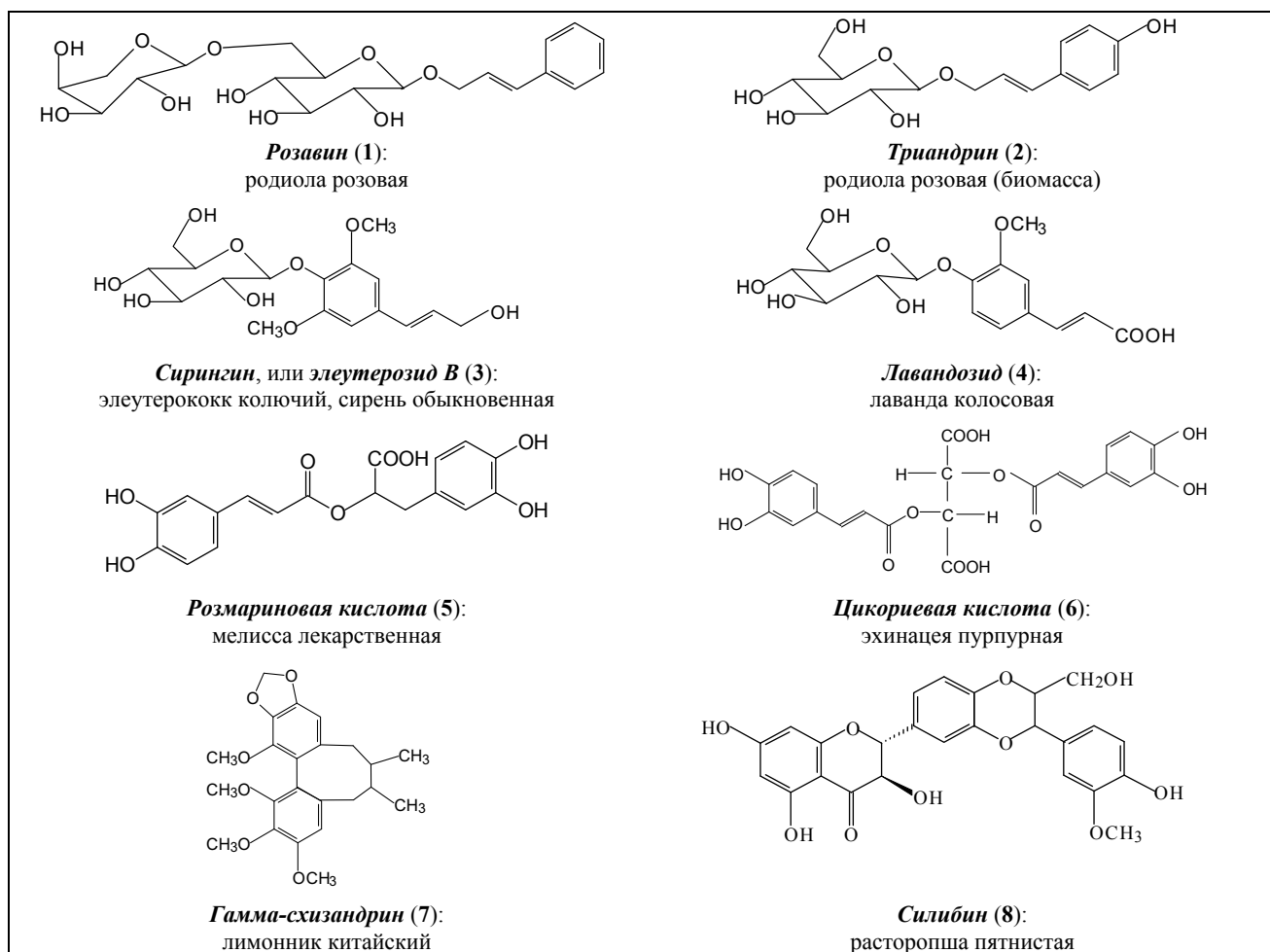


Рис. 1. Фенолпропаноиды лекарственных растений

антраценпроизводные (21–24), представляющие интерес с точки зрения химической стандартизации

сырья и препаратов соответствующих лекарственных растений (рис. 1–3).

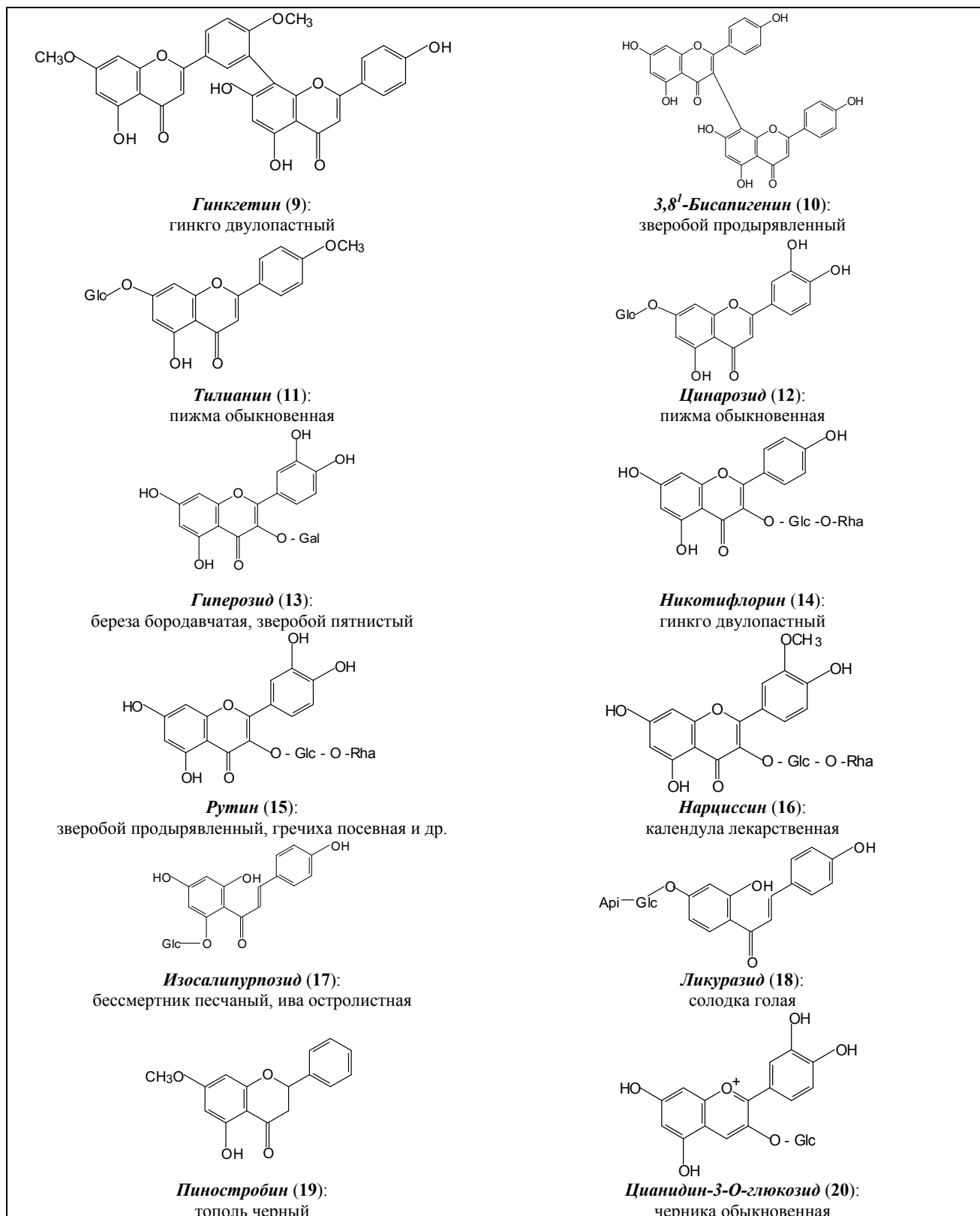


Рис. 2. Флавоноиды лекарственных растений

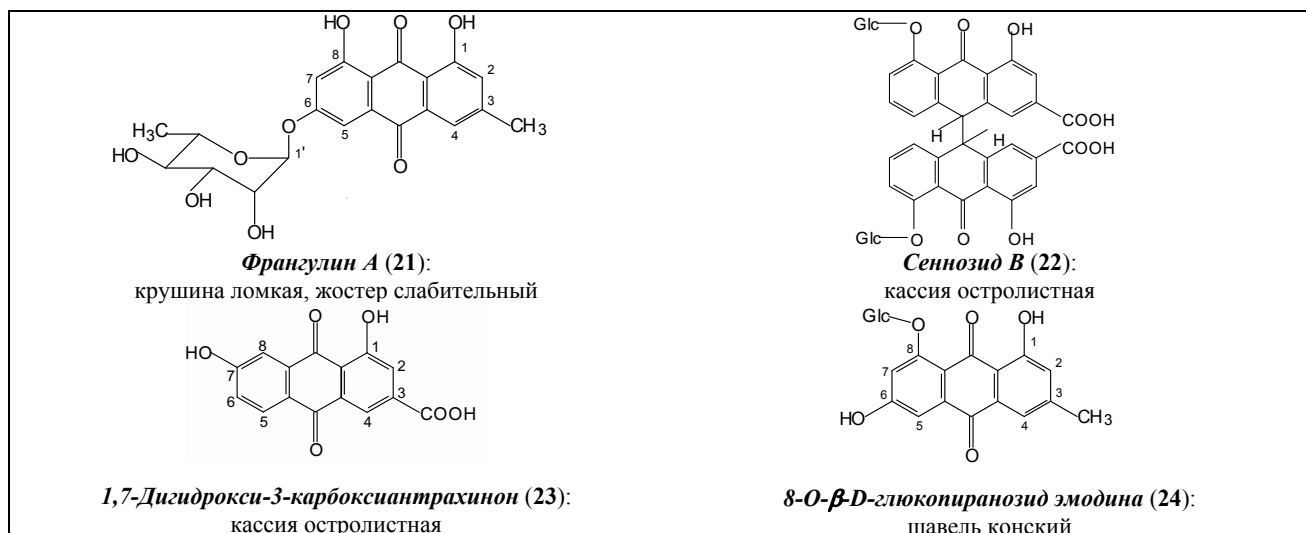


Рис. 3. Антраценпроизводные лекарственных растений

На основе изучения химического состава целого ряда видов ЛРС сформулированы подходы к стандартизации сырья и фитопрепаратов, заключающиеся в использовании в методиках анализа стандартных образцов розавина (родиола розовая), триандрина (биомасса родиолы розовой), синрингина (элеутерококк колючий, сирень обыкновенная), силибина (расторопша пятнистая), лавандозиды (лаванда колосовая), розмариновой кислоты (мелисса лекарственная), цикориевой кислоты (эхинацея пурпурная), гамма-схизандрин (лимонник китайский), гинкгетина (гинкго двулопастный), 3,8¹¹-биаспигенина (зверобой продырявленный), тилианина (пижма обыкновенная), цинарозиды (пижма обыкновенная), гиперозиды (береза бородавчатая, зверобой пятнистый), никотифлорина (гинкго двулопастный), нарциссина (календула лекарственная), изосалипурпозиды (бессмертник песчаный), ликуразиды (солодка голая), пиностробина (тополь черный), цианидин-3-О-глюкозида (черника обыкновенная), франгулина А (крушина ломкая, жостер слабительный), сеннозиды В (кассия остролистная), 1,7-дигидрокси-3-карбоксиантрахинона (кассия остролистная), 8-О-β-D-глюкопиранозиды эмодина (щавель конский).

В результате проведенных исследований обоснованы новые подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов, содержащих фенилпропаноиды, флавоноиды и антраценпроизводные, с использованием ТСХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии и соответствующих стандартных образцов. Результаты данных исследований создают методологическую основу для со-

вершенствования нормативной документации на ЛРС и другие фармацевтические субстанции, а также для успешного решения одной из актуальных задач современной фармации – создания и внедрения лекарственных средств, в том числе импортозамещающих препаратов.

ВЫВОДЫ

На основе изучения химического состава целого ряда лекарственных растений, а также зависимостей физических, физико-химических, спектральных и фармакологических свойств от химической природы выделенных веществ, используемых в качестве критерия подлинности и качества сырья и фитопрепаратов, показано, что БАС следует рассматривать как важнейшую модель в формировании методологической базы для научного обоснования химической классификации ЛРС, методов стандартизации и технологических способов получения, а также показаний к применению соответствующих лекарственных растительных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быков В.А., Запесочная Г.Г., Куркин В.А. Родиола розовая (*Rhodiola rosea* L.): Традиционные и биотехнологические аспекты получения лекарственных средств (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 1999. Т. 33. № 1. С. 28–37.
2. Дубичев А.Г., Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Воронцов Е.Д. Изучение химического состава корневищ *Rhodiola rosea* методом ВЭЖХ // Химия природных соединений. 1991. № 2. С. 188–193.
3. Зайцева Е.Н., Куркина А.В., Куркин В.А., Правдивцева О.Е., Дубищев А.В. Сравнительное изучение диуретической активности водных извлечений лекарст-

- венных растений, содержащих флавоноиды // Фармация. 2013. № 7. С. 33–35.
4. *Запесочная Г.Г., Куркин В.А.* Флавоноиды корневищ *Rhodiola rosea*. II. Флаволигнан и гликозиды гербацептина // Химия природных соединений. 1983. № 1. С. 23–32.
 5. *Куркин В.А.* Фенилпропаноиды – перспективные природные биологически активные соединения. Самара: СамГМУ. 1996. 80 с.
 6. *Куркин В.А.* Современные аспекты химической классификации биологически активных соединений лекарственных растений // Фармация. 2002. Т. 50. № 2. С. 8–16.
 7. *Куркин В.А.* Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов.). 2-е изд-е, перераб. и доп. Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава». 2007. 1239 с.
 8. *Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Дубичев А.Г., Воронцов Е.Д., Александрова И.В.* Фенилпропаноиды каллусной культуры *Rhodiola rosea* // Химия природных соединений. 1991. № 4. С. 481–490.
 9. *Куркин В.А.* Родиола розовая (золотой корень): стандартизация и создание лекарственных препаратов: монография. Самара: ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России. 2015. 240 с.
 10. *Куркин В.А.* Расторопша пятнистая – источник лекарственных средств (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37. № 4. С. 27–41.
 11. *Куркин В.А., Дубищев А.В., Ежков В.Н., Титова И.Н.* Антидепрессантная активность некоторых фитопрепаратов и фенилпропаноидов // Химико-фармацевтический журнал. 2006. Т. 40. № 11. С. 144–149.
 12. *Куркин В.А., Дубищев А.В., Ежков В.Н. и др.* Ноотропная активность некоторых фитопрепаратов и фенилпропаноидов // Растительные ресурсы. 2007. Т. 43. Вып. 2. С. 76–88.
 13. *Куркин В.А., Правдивцева О.Е.* Зверобой: итоги и перспективы создания лекарственных средств: Монография. Самара: ГОУ ВПО «СамГМУ»; ООО «Офорт». 2008. 127 с.
 14. *Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Рыжов В.М., Попова Л.Л., Грядунов П.Е.* Расторопша пятнистая: Монография. Самара: ГОУ ВПО «СамГМУ»; ООО «Офорт». 2010. 118 с.
 15. *Куркин В.А., Запесочная Г.Г.* Химический состав и фармакологические свойства растений рода родиола (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 1986. Т. 20. № 10. С. 1231–1244.
 16. *Куркин В.А., Запесочная Г.Г.* Флаволигнаны и другие природные лигнаноиды. Проблемы структурного анализа // Химия природных соединений. 1987. № 1. С. 11–34.
 17. *Куркин В.А., Авдеева О.И., Авдеева Е.В., Мизина П.Г.* Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части *Echinacea purpurea* (L.) Moench. // Растительные ресурсы. 1998. Т. 34. Вып. 2. С. 81–85.
 18. *Куркин В.А., Ламрини М., Ключков С.Г.* Лавандозид цветков *Lavandula spica* // Химия природных соединений. 2008. № 2. С. 133–134.
 19. *Куркин В.А., Мазур Л.И., Алексеева А.А., Авдеева Е.В.* Мелисса лекарственная: перспективы использования в педиатрии: Монография. Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ». 2010. 164 с.
 20. *Куркин В.А., Сатдарова Ф.Ш.* Лимонник китайский: итоги и перспективы создания лекарственных средств: монография. Самара: ООО «Офорт»; ГОУ ВПО «СамГМУ». 2010. 139 с.
 21. *Куркин В.А., Рязанова Т.К., Куркина А.В., Егорова А.В.* Разработка методики определения антоцианов в лекарственном растительном сырье // Фармация. 2014. № 4. С. 17–20.
 22. *Куркин В.А., Шмыгарева А.А.* Антрагликозиды коры крушины ломкой (*Frangula alnus* Mill.) // Химия растительного сырья. 2012. № 1. 83–86.
 23. *Куркин В.А., Рязанова Т.К., Петрухина И.К.* Черника обыкновенная: современные подходы к стандартизации и созданию лекарственных препаратов: монография. Самара: ООО «Офорт»; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России. 2014. 127 с.
 24. *Куркина А.В., Рязанова Т.К., Куркин В.А.* Флавоноиды надземной части *Polygonum hydropiper* // Химия природных соединений. 2013. № 5. С. 715–716.
 25. *Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Луценко Е.В., Быков В.А.* Растительные флаволигнаны. Биологическая активность и терапевтический потенциал. М. 2006. 235 с.
 26. *Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П.* Фармакогнозия: Учебник. М.: Медицина. 2002. 656 с.
 27. *Рыжов В.М., Куркин В.А., Авдеева Е.В., Лужнов Н.Д.* Перспективы использования ВЭЖХ для стандартизации гепатопротекторного лекарственного средства «Силимар» // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2010. № 7. С. 26–29.
 28. *Kurkin V.A.* Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity // Chemistry of Natural Compounds. 2003. V. 39. P. 123–153.
 29. *Kurkin V.A., Shmygareva A.A.* The development of new approaches to standardization of *Cassia acutifolia* leaves // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2014. V. 3. № 3. P. 163–167.
 30. *Запесочная Г.Г., Куркин В.А.* Glycosides of cinnamyl alcohol from the rhizomes of *Rhodiola rosea* // Chemistry of Natural Compounds. 1982. V. 18. № 6. P. 685–688.

Поступила 7 декабря 2015 г.

THE METABOLITES OF THE MEDICINAL PLANTS AS THE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

© V.A. Kurkin, 2016

V.A. Kurkin

Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Samara State Medical University

E-mail: Kurkinvladimir@yandex.ru

In the present paper conceptually are considered biologically active compounds of medicinal plants as an important model in the formation of specialists in the field of pharmacy. It is substantiated that the chemical classification of medicinal vegetative raw materials is of fundamental importance, not only for pharmacognosy, but for phytotherapy, in which case the chemical structure of biologically active compounds should be

regarded as a methodological base in terms explain the characteristics of pharmacotherapeutic action, prognosis of pharmacological effects, the scientific substantiation of technology of obtaining of preparations, and also find ways to achieve efficiency and safety of treatment with preparations on the basis of the herbal materials. In the present paper are discussed also the relationships between the physical, physical-chemical, spectral, pharmacological properties and the chemical structures of biologically active compounds, which are used as the criterion for the authenticity and quality of herbal materials and phytopharmaceuticals. The expediency of introduction in pharmacognosy a new concept – the leading group of biologically active compounds, as well as the need for interpretation of the significance of the manifestations of pharmacological effects of not one, and usually several groups of active substances.

Key words: pharmacy, pharmacognosy, medicinal plants, herbal materials, metabolites, biologically active compounds, phytopharmaceuticals, standardization.

References

1. Bykov V.A., Zapesoch'naja G.G., Kurkin V.A. Rodiola rozovaja (*Rhodiola rosea* L.): Tradicijnyje i biotekhnologičeskie aspekty polučeniya lekarstvennyh sredstv (obzor) // Himiko-farmaceutičeskij zhurnal. 1999. T. 33. № 1. S. 28–37.
2. Dubičev A.G., Kurkin V.A., Zapesoch'naja G.G., Voroncov E.D. Izučenie himičeskogo sostava kornevišh *Rhodiola rosea* metodom VJeZhH // Himija prirodnyh soedinenij. 1991. № 2. S. 188–193.
3. Zajceva E.N., Kurkina A.V., Kurkin V.A., Pravdivceva O.E., Dubišhev A.V. Sravnitel'noe izučenie diuretičeskoj aktivnosti vodnyh izvlečenij lekarstvennyh rastenij, sodержashhij flavonoidy // Farmacija. 2013. № 7. S. 33–35.
4. Zapesoch'naja G.G., Kurkin V.A. Flavonoidy kornevišh *Rhodiola rosea*. II. Flavolignan i glikozidy gerbacetina // Himija prirodnyh soedinenij. 1983. № 1. S. 23–32.
5. Kurkin V.A. Fenilpropanoidy – perspektivnye prirodnye biologičeski aktivnye soedinenija. Samara: SamGMU. 1996. 80 s.
6. Kurkin V.A. Sovremennye aspekty himičeskoj klassifikacii biologičeski aktivnyh soedinenij lekarstvennyh rastenij // Farmacija. 2002. T. 50. № 2. S. 8–16.
7. Kurkin V.A. Farmakognozija: Učeb. dlja studentov farmaceutičeskijh vuzov (fakul'tetov.). 2-e izd-e, pererab. i dop. Samara: OOO «Ofort»; GOU VPO «SamGMU Roszdrava». 2007. 1239 s.
8. Kurkin V.A., Zapesoch'naja G.G., Dubičev A.G., Voroncov E.D., Aleksandrova I.V. Fenilpropanoidy kallusnoj kul'tury *Rhodiola rosea* // Himija prirodnyh soedinenij. 1991. № 4. S. 481–490.
9. Kurkin V.A. Rodiola rozovaja (zolotoj koren'): standar-tizacija i sozdanie lekarstvennyh preparatov: monografija. Samara: OOO «Ofort»; GBOU VPO SamGMU Min-zdrava Rossii. 2015. 240 s.
10. Kurkin V.A. Rastropsha pjatnistaja – istočnik lekarstvennyh sredstv (obzor) // Himiko-farmaceutičeskij zhurnal. 2003. T. 37. № 4. S. 27–41.
11. Kurkin V.A., Dubišhev A.V., Ezhkov V.N., Titova I.N. Antidepressantnaja aktivnost' nekotoryh fitopreparatov i fenilpropanoidov // Himiko-farmaceutičeskij zhurnal. 2006. T. 40. № 11. S. 144–149.
12. Kurkin V.A., Dubišhev A.V., Ezhkov V.N. i dr. Nootropnaja aktivnost' nekotoryh fitopreparatov i fenilpropanoidov // Rastitel'nye resursy. 2007. T. 43. Vyp. 2. S. 76–88.
13. Kurkin V.A., Pravdivceva O.E. Zverboj: itogi i perspektivy sozdaniya lekarstvennyh sredstv: Monografija. Samara: GOU VPO «SamGMU»; OOO «Ofort». 2008. 127 s.
14. Kurkin V.A. Zapesoch'naja G.G., Avdeeva E.V., Ryzhov V.M., Popova L.L., Grjadunov P.E. Rastropsha pjatnistaja: Monografija. Samara: GOU VPO «SamGMU»; OOO «Ofort». 2010. 118 s.
15. Kurkin V.A., Zapesoch'naja G.G. Himičeskij sostav i farmakologičeskie svojstva rastenij roda *rodia* (obzor) // Himiko-farmaceutičeskij zhurnal. 1986. T. 20. № 10. S. 1231–1244.
16. Kurkin V.A., Zapesoch'naja G.G. Flavolignany i drugie prirodnye lignoidy. Problemy strukturnogo analiza // Himija prirodnyh soedinenij. 1987. № 1. S. 11–34.
17. Kurkin V.A., Avdeeva O.I., Avdeeva E.V., Mizina P.G. Kolichestvennoe opredelenie summy gidroksikorichnyh kislot v nadzemnoj časti *Echinacea purpurea* (L.) Moench. // Rastitel'nye resursy. 1998. T. 34. Vyp. 2. S. 81–85.
18. Kurkin V.A., Lamrini M., Kločkov S.G. Lavandozid cvetkov *Lavandula spica* // Himija prirodnyh soedinenij. 2008. № 2. S. 133–134.
19. Kurkin V.A., Mazur L.I., Alekseeva A.A., Avdeeva E.V. Melissa lekarstvennaja: perspektivy ispol'zovanija v pediatrii: Monografija. Samara: OOO «Ofort»; GOU VPO «SamGMU». 2010. 164 s.
20. Kurkin V.A., Satdarova F.Sh. Limonnik kitajskij: itogi i perspektivy sozdaniya lekarstvennyh sredstv: monografija. Samara: OOO «Ofort»; GOU VPO «SamGMU». 2010. 139 s.
21. Kurkin V.A., Rjazanova T.K., Kurkina A.V., Egorova A.V. Razrabotka metodiki opredelenija antocianov v lekarstvennom rastitel'nom syr'e // Farmacija. 2014. № 4. S. 17–20.
22. Kurkin V.A., Shmygareva A.A. Antraglikozidy kory krushiny lomkoj (*Frangula alnus* Mill.) // Himija rastitel'nogo syr'ja. 2012. № 1. 83–86.
23. Kurkin V.A., Rjazanova T.K., Petruhina I.K. Chernika obyknovennaja: sovremennye podhody k standartizacii i sozdaniyu lekarstvennyh preparatov: monografija. Samara: OOO «Ofort»; GBOU VPO SamGMU Minzdrava Rossii. 2014. 127 s.
24. Kurkina A.V., Rjazanova T.K., Kurkin V.A. Flavonoidy nadzemnoj časti *Polygonum hydropiper* // Himija prirodnyh soedinenij. 2013. № 5. S. 715–716.
25. Lucenko S.V., Fel'dman N.B., Lucenko E.V., Bykov V.A. Rastitel'nye flavolignany. Biologičeskaja aktivnost' i terapevtičeskij potencial. M. 2006. 235 s.
26. Murav'eva D.A., Samylina I.A., Jakovlev G.P. Farmakognozija: Učebnik. M.: Medicina. 2002. 656 s.
27. Ryzhov V.M., Kurkin V.A., Avdeeva E.V., Luzhnov N.D. Perspektivy ispol'zovanija VJeZhH dlja standartizacii gepatoprotektornogo lekarstvennogo sredstva «Silimar» // Voprosy biologičeskoj medicinskoj i farmaceutičeskoj himii. 2010. № 7. S. 26–29.
28. Kurkin V.A. Phenylpropanoids from Medicinal Plants: Distribution, Classification, Structural Analysis, and Biological Activity // Chemistry of Natural Compounds. 2003. V. 39. P. 123–153.
29. Kurkin V.A., Shmygareva A.A. The development of new approaches to standardization of *Cassia acutifolia* leaves // Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. 2014. V. 3. № 3. P. 163–167.
30. Zapesoch'naja G.G., Kurkin V.A. Glycosides of cinnamyl alcohol from the rhizomes of *Rhodiola rosea* // Chemistry of Natural Compounds. 1982. V. 18. № 6. P. 685–688.

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, ПРИМЕНЕНИЕ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ *PETROSELINUM CRISPUM* НАСТОЙКИ ГОМЕОПАТИЧЕСКОЙ МАТРИЧНОЙ

Я.Ф. Копытько

к.фарм.н., вед. науч. сотрудник, лаборатория аналитической химии, отдел стандартизации,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: yanina@kopytko.ru

Представлены данные по химическому составу, применению в медицине, а также анализу *Petroselinum crispum* настойки гомеопатической матричной методом ГЖХ-МС. Разработана методика количественной оценки суммы фенольных веществ в пересчете на апигенин методом спектрофотометрии.

Ключевые слова: *Petroselinum crispum*, настойка гомеопатическая, состав, количественное определение.

Петрушка (*Petroselinum crispum* Mill., *Apiaceae*) (синонимы *P. sativum* Hoffm., *P. hortense* Auct. non Hoffm.) является древнейшим средством традиционной медицины. Это растение обладает широким диапазоном доказанной фармакологической активности: ветрогонным, гастротонизирующим, гепатопротективным, спазмолитическим, диуретическим, антисептическим, противовоспалительным, иммуномодулирующим, хемо-превентивным, антиоксидантным действием. В традиционной и народной медицине *Petroselinum crispum* применяется при болезнях мочевых путей и уролитиазе, желудочно-кишечных расстройствах, аменорее, дисменорее, заболеваниях сердца, отитах, диабете, кожных заболеваниях и др. [1–7], при различных уринарных симптомах, цистите, дизурии, уретритах, гонорее и других заболеваниях [8].

Петрушка содержит значительное количество эфирного масла. Известны три культурных разновидности петрушки, которые несколько различаются по химическому составу – *Petroselinum crispum* var. *latifolium* (обычная), var. *crispum* (курчавая) и var. *tuberosum* (корневая). Эфирномасличный состав листовых и корневой разновидностей примерно одинаков. Основными компонентами (10–30%) являются миристицин, лимонен и 1,3,8-п-ментатриен. Сорты с курчавыми листьями (var. *crispum*), как правило, содержат больше миристицина, но значительно меньше эфирного масла, чем var. *latifolium* (0,01 и 0,04% соответственно).

По химическому составу эфирного масла из плодов различают три хемотипа петрушки: апиоловый (60–70% апиола), миристициновый (50–70%

миристицина) и аллилтетраметоксибензоловый (50–60% 1-аллил-1,3,4,5-тетраметоксибензола – АТМБ) [9].

В эфирном масле петрушки наряду с апиолом и миристицином также обнаружены мирцен, лимонен, β-фелландрен, терпинолен, *para*-, α-диметилстирен, 1,3,8-*para*-ментатриен, *para*-цимен-8-ол, криптон, фелландраль, п-фарнезен, гермакрен, β-сесквифелландрен, кадинен, неофитадиен, пальмитиновая кислота, фитол, которые предлагаются в качестве маркерных компонентов для идентификации сырья [10].

P. crispum содержит флавоноиды апигенин, апигенин-7-О-глюкозид (космосин), апигенин-7-О-апиозил-О-глюкозид (апиин), 6-ацетилапиин, а также витамин С, каратиноиды, хлорофил, кумарин 2''3''-дигидроксифуранокумарин (оксипеуседанин гидрат). Установлено, что апигенин, космосин и кумарин проявляют выраженную активацию агрегации тромбоцитов [11, 12]. Упоминается об обнаружении в траве петрушки курчавой также витексина, рутина, кемпферола, лютеолин-7-гликозида, кверцетина, фенолкарбоновых кислот (галловой, изоферуловой, хлорогеновой, неохлорогеновой), катехина, о-метоксикумарина, о-кумаровой кислоты, дигидрокумарина [13]. В дихлорметановом извлечении из корней петрушки обнаружены следовые количества токсичных полиинов [14], в корнях найдены фотосенсибилизирующие фуранокумарины бергаптен и изоимператорин.

Выявлен терапевтический эффект водного экстракта травы петрушки на модели развития почечных камней у крыс, вызванного этиленгли-

колем [15]; обнаружено понижение уровня глюкозы при стрептозотоцин-индуцированном диабете [16].

Установлена цитостатическая активность экстракта семян петрушки на клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2), а также антиоксидантное, антибактериальное и противовоспалительное действие, что может использоваться для разработки потенциального терапевтического противоопухолевого агента [17]. Экстракт травы петрушки и апиин проявляют ингибирующую активность на нейраминидазу вируса гриппа [18].

Выявлена нематическая активность эфирного масла и метанольного экстракта травы *P. crispum* против *Meloidogyne spp.* (*M. incognita*, *M. hapla* и *M. arenaria*) [19] и акарицидное действие плодов петрушки, содержащихся в них апиола и его производных на *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farina* и *Tyrophagus putrescentiae* [20].

В опытах на крысах установлено, что этанольный экстракт *P. crispum* гепатотоксичен и нефротоксичен в пероральных дозах, равных или превышающих 1000 мг/кг. Таким образом, требуется осторожность при назначении во избежание передозировки и взаимодействия с некоторыми лекарствами. Кроме того, петрушка способна к биоаккумуляции токсичных металлов, что требует ее выращивания на почвах, куда не попадают сточные воды [21].

Гомеопатическая фармакопея Германии [22] содержит статью *P. crispum*, включающую характеристики настойки гомеопатической матричной (НГМ), изготавливаемой из свежей травы, собранной в начале цветения, с использованием 90%-ного этилового спирта. Подлинность устанавливают на флавоноиды по цианидиновой пробе и методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на готовых пластинках со слоем силикагеля в системе этилацетат–толуол (7:93). Испытуемый раствор готовят экстракцией НГМ гексаном. В качестве растворов сравнения используют растворы борнеола и борнилацетата в спирте метиловом. Обнаружение зон на хроматограмме проводят опрыскиванием раствором анисового альдегида с последующим нагреванием при 105–110 °С в течение 5–10 мин. Содержание сухого остатка не менее 1,8%, плотность – от 0,900 до 0,920.

Цель исследования – изучение некоторых групп биологически активных веществ и разработка методик стандартизации и критериев качества *P. crispum* НГМ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследуемые образцы НГМ *P. crispum* изготавливали из свежесобранной травы по правилам гомеопатической технологии в соответствии с методом 3 ОФС 42-0027-05 «Настойки гомеопатические матричные». Испытание методом ТСХ осуществляли на пластинках со слоем силикагеля Сорбфил ПТСХ-П-А УФ (ТУ 26-11-17-89, Россия), спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре Cary 100 Scan («Varian», США). Анализ методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГЖХ-МС) проводили с помощью хромато-масс-спектрометра Varian 450GC-220MS (США) с масс-анализатором типа «ионная ловушка».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве критериев подлинности на НГМ *P. crispum* предложены качественные реакции на дубильные вещества (с железа окисного хлоридом), флавоноиды по цианидиновой пробе, сахара и гликозиды (с раствором пикриновой кислоты в щелочной среде), УФ-спектр разведения НГМ (1:250) в спирте этиловом 70%-ном, на котором в области 250–400 нм должны присутствовать два максимума поглощения при длинах волн 337±1 и 268±1 нм. Было проведено испытание методом ТСХ в системе бутанол–кислота уксусная ледяная–вода (50:5:5:30) с обнаружением веществ фенольной группы в УФ-свете с длиной волны 365 нм. В качестве раствора вещества сравнения использован раствор рутина, положение зоны адсорбции которого совпадает с таковой гликозидов апигенина.

В УФ-свете с длиной волны 365 нм на хроматограмме стандартного раствора обнаруживаются зона рутин зеленовато-коричневого цвета с R_f около 0,50 ($R_s = 1,0$). На хроматограмме настойки должны обнаруживаться зоны: интенсивная зеленовато-коричневого с $R_s = 1,0$ (гликозиды апигенина), коричневато с $R_s = 1,2$, серовато-коричневого 1,7 (апигенин), беловато с $R_s = 1,4$, ярко-красного с $R_s = 1,5$ цветов. Допускается наличие других зон: голубоватого, сероватого и желтоватого цветов от линии нанесения до $R_s = 0,9$.

Определение сухого остатка и плотности проводили по общепринятым методикам; сухой остаток не менее 1,5%, плотность – от 0,900 до 0,925.

Содержание фенольных веществ в НГМ *P. crispum* в пересчете на апигенин оценивали методом спектрофотометрии. В качестве аналитического выбран максимум при 338 ± 2 нм. Вычисленный удельный показатель поглощения аутентичного образца апигенина с чистотой 95% в 70%-ном этиловом спирте равен 880.

Около 0,1 г (точная навеска) матричной настойки помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили до метки спиртом этиловым 70%-ным и перемешивали. Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 338 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 70%-ный спирт этиловый (рисунок).

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора РСО апигенина. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали около 0,002 г (точная навеска) РСО апигенина, доводили 70%-ным спиртом этиловым объем раствора до метки, перемешивали. Затем 2 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили 70%-ным спиртом этиловым объем раствора до метки и перемешивали.

Содержание веществ фенольного характера в пересчете на апигенин в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 25},$$

где A_0 и A – оптическая плотность РСО апигенина и испытуемого раствора соответственно; m_0 и m – масса апигенина и настойки, г

или по формуле

$$X = \frac{A \cdot 25}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m} = \frac{A \cdot 25}{880 \cdot m},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса настойки, г; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения апигенина, равный 880.

Содержание веществ фенольного характера в пересчете на апигенин в исследуемых образцах НГМ было от 0,051 до 0,148%.

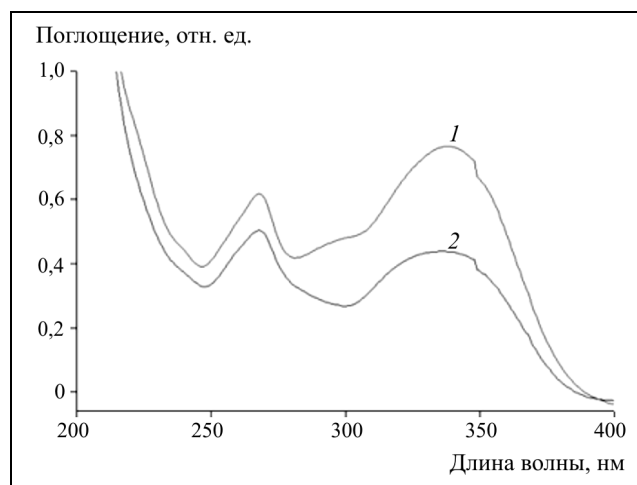
Проведена валидация методики по показателям правильности, сходимости, воспроизводимости,

специфичности, линейности ($y = 113,21x \pm \pm 0,0643$, $R^2 = 0,994$). Относительная погрешность определения разработанной методики не превышает $\pm 5,88\%$ (табл. 1).

Проанализирован состав летучих веществ НГМ, полученной из сырья, заготовленного в Калужской области в 2014 г., методом ГЖХ-МС. Летучие вещества извлекали из НГМ хлороформом, затем растворитель отгоняли, остаток растворяли в этилацетате.

Хроматографическое разделение компонентов пробы осуществляли на кварцевой капиллярной колонке FactorFOUR VF-5ms (30 м \times 0,25 мм). Газ носитель – гелий с постоянной скоростью потока 1,0 мл/мин. В инжектор хроматографа при температуре 200 °С (деление потока 5) вводили по 1 мкл пробы. Температурная программа колонки: 50 °С – 1 мин, нагрев до 110 °С со скоростью 20 °С/мин, 110 °С – 1 мин, нагрев до 250 °С со скоростью 7°С/мин, изотерма при 250 °С до 33 мин.

Разделенные компоненты идентифицировали с использованием библиотеки масс-спектров NIST Version 2f и алгоритмов сравнения программного обеспечения «Saturn» (Varian). Количественную оценку осуществляли методом нормализации по площади пиков (полный ионный ток) идентифицированных соединений с использованием авто-



УФ-спектры раствора РСО апигенина (1) и разведения настойки *P. crispum* (2) в спирте этиловом

Таблица 1. Метрологические характеристики результатов количественного определения фенольных веществ в пересчете на апигенин

n	f	p (%)	$T(p, f)$	$X\%$	S^2	S	S_x	$\Delta X_{\text{ср}}$	ΔX	$\bar{E}\%$	$E\%$
5	4	95	2,78	0,147	$9,7 \cdot 10^{-6}$	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$1,39 \cdot 10^{-3}$	$3,87 \cdot 10^{-3}$	$8,65 \cdot 10^{-3}$	2,63	5,88

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5
27	8,781	Миристицин	499884	5,19
28	8,872	Неизвестное	40803	0,42
29	9,082	Неизвестное	19037	0,20
30	9,434	Неизвестное	100056	1,04
31	9,579	Апиол	313256	3,25
32	9,609	7(11)-Селинен-4 α -ол (можжевеловая камфора)	76056	0,79
33	9,699	7(11)-Селинен-4 α -ол (можжевеловая камфора)	89614	0,93
34	9,75	Неизвестное	57901	0,60
35	9,813	Неизвестное	31275	0,32
36	9,919	1-Гептатриакотанол	131968	1,37
37	10,041	Изоаромадендрен эпоксид	84770	0,88
38	10,208	Неизвестное	69325	0,72
39	10,3	Неизвестное	74486	0,77
40	10,493	13-метил-тетрадекановой кислоты этиловый эфир (C15:0)	44276	0,46
41	10,668	Z-(13,14-эпокси)тетрадец-11-ен-1-ол ацетат	86531	0,90
42	10,793	Бутилоктиловый эфир 1,2-бензолдикарбоксилловой кислоты	280659	2,91
43	10,822	Цис -1- этилиденоктагидро-7 α -метил-1Н-инден	462585	4,80
44	10,941	Олеиновая кислота (C18:1)	260977	2,71
45	10,962	Пальмитиновой кислоты (C16:0) этиловый эфир	295593	3,07
46	11,138	Фалкаринол	59244	0,62
47	11,351	Неизвестное	48694	0,51
48	11,483	Изобергаптен	141202	1,47
49	11,672	3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол	1170000	12,15
50	11,815	Фитол	120621	1,25
51	11,898	9-цис,11-транс-октадекадиеновой кислоты этиловый эфир (C18:2)	1770000	18,38
52	11,902	n-Пропиловый эфир 9,12-октадекадиеновой кислоты (C18:2)	409741	4,25
53	11,935	Линоленовой кислоты этиловый эфир (C18:3)	1670000	17,34
54	12,036	2-[[2-[(2-этилциклопропил)-метил]циклопропаноктановой кислоты метиловый эфир	11456	0,12
55	12,074	Неизвестное	45457	0,47
56	12,158	Эйкозен (C20)	59312	0,62
57	12,209	Трикозан (C23)	68294	0,71
58	12,558	Изопимпинеллин	23078	0,24
59	13,286	7-Гексадеценаль	48917	0,51
60	13,429	10,13-эйкозадиеновой кислоты этиловый эфир (C20:2)	48339	0,50
61	13,628	Неизвестное	21514	0,22
62	13,731	Неизвестное	25645	0,27
63	13,817	Эйкозен-1 (C20)	22573	0,23
64	13,894	2-Гексил-1-деканол	17107	0,18
65	15,557	Тетракозан (C24)	9175	0,10
Всего			9630947	100

ВЫВОДЫ

1. На основании полученных результатов предложены критерии подлинности и методики оценки качества НГМ *Petroselinum crispum*, которые будут включены в проект фармакопейной статьи.
2. Исследование летучих веществ, содержащихся в образце НГМ, методом ГЖХ-МС выявило основные компоненты: этиловые эфиры 9-*цис*,11-*транс*-октадекадиеновой и линоленовой кислот, 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол, миристицин, *цис*-1-этилиденоктагидро-7 α -метил-1H-инден и апиол, что показывает, что состав летучих веществ петрушки и соответственно НГМ варьируется от места и условий произрастания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Farzaei M.H., Abbasabadi Z., Ardekani M.R., Rahimi R., Farzaei F. Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities // J. Tradit. Chin. Med. 2013. V. 33. № 6. P. 815–826.
2. Yousofi A., Daneshmandi S., Soleimani N., Bagheri K., Karimi M.H. Immunomodulatory effect of Parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil on immune cells: mitogen-activated splenocytes and peritoneal macrophages // Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2012. V. 34. № 2. P.303–308.
3. Petrolini F.V., Lucarini R., de Souza M.G., Pires R.H., Cunha W.R., Martins C.H. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections // Braz. J. Microbiol. 2013. V. 44. № 3. P.829–834.
4. Dorman H.J., Lantto T.A., Raasmaja A., Hiltunen R. Antioxidant, pro-oxidant and cytotoxic properties of parsley // Food. Funct. 2011. V.2. № 6. P. 328–337.
5. Alyami F.A., Rabah D.M. Effect of drinking parsley leaf tea on urinary composition and urinary stones' risk factors // Saudi. J. Kidney. Dis. Transpl. 2011. V. 22. № 3. P. 511–514.
6. Patel D., Shukla S., Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review) // Int. J. Oncol. 2007. V. 30. № 1. P. 233–245.
7. Moazedi A.A., Mirzaie D.N., Seyyednejad S.M., Zadkarami M.R., Amirzargar A. Spasmolytic effect of *Petroselinum crispum* (Parsley) on rat's ileum at different calcium chloride concentrations // Pak. J. Biol. Sci. 2007. V 10. № 22. P. 4036–4042.
8. Беруке В. Materia Medica гомеопатических препаратов. М.: Гомеопатическая медицина. 2008. 720 с.
9. Hildebert W., Bladt S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas Springer Science & Business Media. 2009. P. 399.
10. Зотикова О.А., Кисличенко В.С., Вельма В.В. Сравнительный анализ химического состава эфирного масла листьев растений рода *Petroselinum*, культивируемых в Украине // Научные ведомости БелГУ. 2013. № 18 161. Вып. 23. С. 220–224.
11. Kuźma P., Drużyńska B., Obiedziński M. Optimization of extraction conditions of some polyphenolic compounds from parsley leaves (*Petroselinum crispum*) // Acta Sci. Pol. Technol Aliment. 2014. V.13. № 2. P. 145–154.
12. Chaves D.S., Frattani F.S., Assafim M., de Almeida A.P., de Zingali R.B., Costa S.S. Phenolic chemical composition of *Petroselinum crispum* extract and its effect on haemostasis // Nat. Prod. Commun. 2011. V. 6. № 7. P. 961–964.
13. Тангиева Т.А., Маркарян А.А., Даргаева Т.Д. Качественная и количественная оценка фенольных соединений, содержащихся в сырье петрушки кудрявой // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. 2014. № 3. С. 106–114.
14. Zidorn C., Jöhrer K., Ganzer M., Schubert B., Sigmund E.M., Mader J., Greil R., Ellmerer E.P., Stuppner H. Polyacetylenes from the Apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley, and parsnip and their cytotoxic activities // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 2518–2523.
15. Saeidi J., Bozorgi H., Zendeheel A., Mehrzad J. Therapeutic effects of aqueous extracts of *Petroselinum sativum* on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats // Urol. J. 2012. V. 9. № 1. P. 361–366.
16. Yanardağ R., Bolkent S., Tabakoğlu-Oğuz A., Özsoy-Saçan O. Effects of *Petroselinum crispum* extract on pancreatic B cells and blood glucose of streptozotocin-induced diabetic rats // Biol. Pharm Bull. 2003. V. 26. № 8. P. 1206–1210.
17. Farshori N.N., Al-Sheddi E.S., Al-Oqail M.M., Musarrat J., Al-Khedhairi A.A., Siddiqui M.A. Cytotoxicity Assessments of *Portulaca oleracea* and *Petroselinum sativum* seed extracts on human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) // Asian. Pac. J. Cancer. Prev. 2014. V. 15. № 16. P. 6633–6638.
18. Hae-Won Lee, Young Hwan Ko. Effects of Apigenin and Ethanol Extract of Parsley (*Petroselinum crispum*) on Viral Neuraminidase Activity // Asian. J.Exp. Biol. Sci. 2012. V. 3. № 4. P. 675–681.
19. Caboni P., Saba M., Oplos C., Aissani N., Maxia A., Menkissoglu-Spiroudi U., Casu L., Ntalli N. Nematicidal activity of furanocoumarins from parsley against *Meloidogyne* spp. against *M. incognita*, *M. hapla* and *M. arenaria* // Pest. Manag. Sci. 2014. Aug 26. doi: 10.1002/ps.3890. [Epub ahead of print]
20. Song H.Y., Yang J.Y., Suh J.W., Lee H.S. Acaricidal activities of apiol and its derivatives from *Petroselinum sativum* seeds against *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, and *Tyrophagus putrescentiae* // J. Agric Food Chem. 2011. V. 59. № 14. P. 7759–7764.
21. Awe E.O., Banjoko S.O. Biochemical and haematological assessment of toxic effects of the leaf ethanol extract of *Petroselinum crispum* (Mill) Nyman ex A.W. Hill (Parsley) in rats // BMC Complement Altern Med. 2013. V.13. P. 75.
22. Homöopathisches Arzneibuch 2000 (HAB 2000). Band 2. Stuttgart: Deutscher apotheker Verlag.

Поступила 20 июля 2015 г.

CHEMICAL COMPOSITION, APPLICATION AND STANDARDIZATION OF *PETROSELINUM CRISPUM* HOMEOPATHIC MOTHER TINCTURES

© Ya.F. Kopytko, 2016

Ya.F. Kopytko

Ph.D. (Pharm.), Senior Research Scientist, Laboratory of Analytical Chemistry, Department of Standardization, All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: yanina@kopytko.ru

The article presents data on the chemical composition, application in medicine, analysis of *Petroselinum crispum*.

For quantitative estimation of phenols in the tincture homeopathic matrix *Petroselinum crispum*, prepared from fresh raw material (herba) maceration in 90% (by volume) with an alcohol, used the technique absorption spectrophotometry is carried out in the maximum at 313 nm using the specific absorption coefficient of apigenin in 70% alcohol equal to 980.

Contents phenolic substances calculated as apigenin in the samples tincture *Petroselinum crispum* was from 0.051 to 0.148%.

A study of volatile substances in the homeopathic tincture matrix *Petroselinum crispum* GLC-MS instrument on Varian 450GC-220MS (column FactorFOUR VF-5ms). The volatiles were removed with chloroform and then the solvent was evaporated and the residue dissolved in ethyl acetate.

In tinctures detected 38 substances – ethyl *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic and linolenic acids (18.38 and 17.34% respectively), 3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecene-1-ol (12; 15%), myristicin (5.19%), *cis*-1-ethyliden-octahydro-7 α -methyl-1H-indene -1-ethylidenoctahydro-7 α -methyl-1H-indene (4.80%) and apiol (3.25%). We have also found a series of terpene compounds *cis*-p-mentha-2,8-dien-1-ol, juniper camphor, β -phellandrene, isoaromadendren epoxide hydrocarbons hexadecene, heneicosane, docosane, eicosene, tricosene, tetracosane, phytol, falkarinol, free oleic acid esters of fatty acids, including cyclopropenoid fatty acids, isobergapten and isopimpenellin.

Key words: *Petroselinum crispum*, homeopathic tincture, composition, quantification.

References

- Farzaei M.H., Abbasbadi Z., Ardekani M.R., Rahimi R., Farzaei F. Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities // J. Tradit. Chin. Med. 2013. V. 33. № 6. P. 815–826.
- Yousofi A., Daneshmandi S., Soleimani N., Bagheri K., Karimi M.H. Immunomodulatory effect of Parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil on immune cells: mitogen-activated splenocytes and peritoneal macrophages // Immunopharmacol. Immunotoxicol. 2012. V. 34. № 2. P.303–308.
- Petrolini F.V., Lucarini R., de Souza M.G., Pires R.H., Cunha W.R., Martins C.H. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections // Braz. J. Microbiol. 2013. V. 44. № 3. P.829–834.
- Dorman H.J., Lantto T.A., Raasmaja A., Hiltunen R. A ntioxidant, pro-oxidant and cytotoxic properties of parsley // Food. Funct. 2011. V.2. № 6. P. 328–337.
- Alyami F.A., Rabah D.M. Effect of drinking parsley leaf tea on urinary composition and urinary stones' risk factors // Saudi. J. Kidney. Dis. Transpl. 2011. V. 22. № 3. P. 511–514.
- Patel D., Shukla S., Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review) // Int. J. Oncol. 2007. V. 30. № 1. P. 233–245.
- Moazedi A.A., Mirzaei D.N., Seyyednejad S.M., Zadkarami M.R., Amirzargar A. Spasmolytic effect of *Petroselinum crispum* (Parsley) on rat's ileum at different calcium chloride concentrations // Pak. J. Biol. Sci. 2007. V 10. № 22. P. 4036–4042.
- Берике В. Materia Medica гомеопатических препаратов. М.: Гомеопатическая медицина. 2008. 720 с.
- Hildebert W., Bladt S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas Springer Science & Business Media. 2009. P. 399.
- Зотикова О.А., Кисличенко В.С., Вельма В.В. Сравнительный анализ химического состава эфирного масла листьев растений рода *Petroselinum*, культивируемых в Украине // Научные ведомости БелГУ. 2013. № 18 161. Вып. 23. С. 220–224.
- Kuźma P., Drużyńska B., Obiedziński M. Optimization of extraction conditions of some polyphenolic compounds from parsley leaves (*Petroselinum crispum*) // Acta Sci. Pol. Technol Aliment. 2014. V.13. № 2. P. 145–154.
- Chaves D.S., Frattani F.S., Assafim M., de Almeida A.P., de Zingali R.B., Costa S.S. Phenolic chemical composition of *Petroselinum crispum* extract and its effect on haemostasis // Nat. Prod. Commun. 2011. V. 6. № 7. P. 961–964.
- Тангиева Т.А., Маркарян А.А., Даргаева Т.Д. Качественная и количественная оценка фенольных соединений, содержащихся в сырье петрушки кудрявой // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. 2014. № 3. С. 106–114.
- Zidorn C., Jöhrer K., Ganzera M., Schubert B., Sigmund E.M., Mader J., Greil R., Ellmerer E.P., Stuppner H. Polyacetylenes from the Apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley, and parsnip and their cytotoxic activities // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 2518–2523.
- Saeidi J., Bozorgi H., Zendeheel A., Mehrzad J. Therapeutic effects of aqueous extracts of *Petroselinum sativum* on ethylene glycol-induced kidney calculi in rats // Urol. J. 2012. V. 9. № 1. P. 361–366.
- Yanardağ R., Bolkent S., Tabakoğlu-Oğuz A., Özsoy-Saçan O. Effects of *Petroselinum crispum* extract on pancreatic B cells and blood glucose of streptozotocin-induced diabetic rats // Biol. Pharm Bull. 2003. V. 26. № 8. P. 1206–1210.
- Farshori N.N., Al-Sheddi E.S., Al-Oqail M.M., Musarrat J., Al-Khedhairi A.A., Siddiqui M.A. Cytotoxicity Assessments of *Portulaca oleracea* and *Petroselinum sativum* Seed Extracts on Human Hepatocellular Carcinoma Cells (HepG2) // Asian. Pac. J. Cancer. Prev. 2014. V. 15. № 16. P. 6633–6638.
- Hae-Won Lee, Young Hwan Ko. Effects of Apigenin and Ethanol Extract of Parsley (*Petroselinum crispum*) on Viral Neuraminidase Activity // Asian. J.Exp. Biol. Sci. 2012. V. 3. № 4. P. 675–681.
- Caboni P., Saba M., Oplos C., Aissani N., Maxia A., Menkissoglu-Spiroudi U., Casu L., Ntalli N. Nematicidal activity of furanocoumarins from parsley against *Meloidogyne* spp. against *M. incognita*, *M. hapla* and *M. arenaria* // Pest. Manag. Sci. 2014. Aug 26. doi: 10.1002/ps.3890. [Epub ahead of print]
- Song H.Y., Yang J.Y., Suh J.W., Lee H.S. Acaricidal activities of apiol and its derivatives from *Petroselinum sativum* seeds against *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, and *Tyrophagus putrescentiae* // J. Agric Food Chem. 2011. V. 59. № 14. P. 7759–7764.
- Awe E.O., Banjoko S.O. Biochemical and haematological assessment of toxic effects of the leaf ethanol extract of *Petroselinum crispum* (Mill) Nyman ex A.W. Hill (Parsley) in rats // BMC Complement Altern Med. 2013. V.13. P. 75.
- Homöopathisches Arzneibuch 2000 (HAB 2000). Band 2. Stuttgart: Deutscher apotheker Verlag.

IN VITRO EVALUATION OF ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *PHYLLANTHUS AMARUS*-A MAGICAL HERB

Neelu Sinha

Ph.D., Reproductive Biology and UNESCO-Trace Element Satellite Centre SOS in Zoology, Jiwaji University, Gwalior, M.P.
Ph.D., Reproductive Biology and UNESCO-Trace Element Satellite Centre SOS in Zoology, Jiwaji University, Gwalior, M.P.

Amita Jaswal

Ph.D., Reproductive Biology and UNESCO-Trace Element Satellite Centre SOS in Zoology, Jiwaji University, Gwalior, M.P.

Sadhana Shrivastava

Ph.D., Reproductive Biology and UNESCO-Trace Element Satellite Centre SOS in Zoology, Jiwaji University, Gwalior, M.P.

Mohd. Salim Reshi

Ph.D., Reproductive Biology and UNESCO-Trace Element Satellite Centre SOS in Zoology, Jiwaji University, Gwalior, M.P.

Chhavi Uthra

Ph.D., Reproductive Biology and UNESCO-Trace Element Satellite Centre SOS in Zoology, Jiwaji University, Gwalior, M.P.

SangeetaShukla

Ph.D., Reproductive Biology and UNESCO-Trace Element Satellite Centre SOS in Zoology, Jiwaji University, Gwalior, M.P.
E-mail: profsshukla@gmail.com, neel236@gmail.com

For use of herbal medicines all over the globe, it is important to evaluate antioxidant activity. The total phenolic content (TPC) and antioxidant activity of ethanolic extract of *Phyllanthus amarus* were evaluated using the Folin-Ciocalteu method, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity and Hydrogen peroxide scavenging activity. The results of present study shows potent antioxidant activity of ethanolic extract of plant.

Key words: antioxidant, *Phyllanthus amarus*, DPPH, H₂O₂.

Due to adverse effects of antibiotics on the host including hypersensitivity, immune-suppression and allergic reactions much attention is now focused on plant extracts with biologically active compounds used in traditional herbal medicine. India has a very long, safe and continuous usage of many herbal drugs in the officially recognized alternative systems of health viz. Ayurveda, Unani, Siddha, Homeopathy and Naturopathy.

Phyllanthus amarus (PA) is widespread throughout the tropics and subtropics in sandy regions as a weed in cultivated and waste lands and also found through the roads, valleys, on the riverbanks and near lakes. This plant is a common arable weed of disturbed ground in southern Florida, the Bahamas, the West Indies and tropical America and is naturalized in the old world tropics [1]. *Phyllanthus*, so aptly called the **wonder plant** perhaps has more useful properties to offer than mankind could ever use [2]. This herb finds its use worldwide for treating problems of stomach, urinogenital system, liver, kidney and spleen. It plays a significant role in Ayurveda, an Indian system of medicine, and is used to treat jaundice, gastropathy, diarrhoea, dysentery, fevers, ulcers and wounds [3].

Measurement and use of plant antioxidant has become indispensable for scientific research and industrial purposes. Biological compounds with antioxidant properties contribute to the protection of cells and tissues against deleterious effects of reactive oxygen species and other free radicals [4]. In the present study, total phenolic contents (TPC) and antioxidant activity of ethanolic extract of PA was evaluated by DPPH and H₂O₂.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of plant extract. *Phyllanthus amarus* whole plant was obtained from the authenticated ayurvedic dealer and identified by the experts of Botany Department, Jiwaji University, Gwalior (India). The shade dried plant was pulverized. The powder of the plant was soaked in 75% ethanol for 10 days with vigorous shaking. Extract was filtered and lyophilized in freeze drier to furnish ethanolic extract.

Free radical scavenging activity by DPPH assay. The free radical scavenging activity of *Phyllanthus amarus* was measured by 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH•) using the method of Blois [5] in tripli-

cate. Briefly, a 0.1 mM solution of DPPH dye in ethanol was prepared and 1 ml of this solution was added to 3 ml of PA solution in water at different concentrations (10–50 µl/ml) respectively. Vitamin C used as a standard at same concentration. The mixture was shaken vigorously and allowed to stand at room temperature for 20 minutes. Then the absorbance was measured at 517 nm using a UV-Vis spectrophotometer. Lower absorbance values of the reaction mixture indicated higher free radical scavenging activity.

Calculation:

$$\text{DPPH} \cdot \text{Scavenging effect (\%)} = [(A_0 - A_1/A_0) \times 100],$$

where A_0 is the absorbance of the control and A_1 is the absorbance in test sample.

Hydrogen peroxide scavenging activity. The hydrogen peroxide scavenging activity of PA was determined using the method of Ruch et al. [6]. Sample with different concentration (10–50 µl/ml and 100–500 µg/ml) of both extracts was added to 3.4 of 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) and mixed with 0.6 ml of 43 mM hydrogen peroxide. After 10 min, the absorbance at 230 of the reaction mixture was recorded. For each concentration, mixture without sample was used as control and mixture without H_2O_2 was used as blank and percentage inhibition was calculated.

Calculation:

$$\% \text{ inhibition } [H_2O_2] = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100,$$

where A_0 was the absorbance of the control, and A_1 was the absorbance of the sample. Ascorbic acid was taken as standard.

Total phenolic contents. Folin-Ciocalteu method is sensitive, quantitative and relatively independent of the degree of polymerization (e.g. mono-, di or trimer), Phenols stoichiometrically reduce phosphomolybdic/phosphotungstic acid and was determined. [7]. The amounts of phenolics in PA was determined with Folin-Ciocalteu reagent. To 50 ml of each sample (3 replicates), 2.5 ml of 10 times dilution of Folin-Ciocalteu reagent and 2 ml of Na_2CO_3 were added and the resulting mixture was incubated for 2 h. The absorbance of all samples was measured at 765 nm.

Calculation: the total phenol was determined using a standard curve prepared with different concentration of tannic acid. The results were expressed in milligrams per gram fresh weight.

RESULTS AND DISCUSSION

To evaluate the antioxidant activity of natural compounds, DPPH assay is widely used as a free radical. Antioxidant activity of PA using DPPH dye is

shown in table 1. PA at different doses, i.e. 10–50 µg/ml showed free radical scavenging activity in dose dependent manner. Maximum percentage inhibition of DPPH radicals by the antioxidant activity of PA using DPPH dye was about 75.9% at a concentration of 50µg/ml. Ascorbic acid, as a standard drug showed about 88.3% inhibition of the DPPH radicals at 50 µg/ml. H_2O_2 scavenging activity of PA was dose dependent as demonstrated in table 2. The maximum H_2O_2 scavenging activity of PA at 50 µg/ml is 80.6% which is comparable with ascorbic acid 50 µg/ml. The amount of total phenolic components of PA were calculated as tannic acid equivalents which was found to be 430 µg/mg in samples indicating considerable free radical scavenging activity:

Extract *Phyllanthus amarus*
 Concentration 1 mg
 Tannic acid equivalent 430 µg/mg

Plants are the source of free radical scavengers like polyphenols, flavonoids and phenolic compounds which help in prevention and repairing damages caused by ROS [8]. At low or moderate concentrations, generally reactive oxygen species (ROS) exert beneficial effects on cellular responses and immune function but at high levels, a deleterious process can damage cell structures, including lipids, proteins, and DNA. The human body has several mechanisms to counteract oxidative stress by producing antioxidants, which are either naturally produced in situ, or externally supplied through foods

Table 1. Free radical scavenging activity at various concentrations of PA

Concentration, µg/ml	DPPH Inhibition (%)	
	Ascorbic acid	<i>Phyllanthus amarus</i>
10	70.9 ± 3.91	60.8 ± 3.36
20	77.4 ± 4.27	70 ± 3.86
30	80.2 ± 4.43	72 ± 3.98
40	84.6 ± 4.67	74.8 ± 4.13
50	88.3 ± 4.88	75.9 ± 4.19

Values are mean ± SE of triplicate determinations.

Table 2. H_2O_2 Scavenging *Phyllanthus amarus* crude extract

Concentration, µg/ml	Inhibition (%)	
	Ascorbic acid	<i>Phyllanthus amarus</i>
10	26 ± 1.43	28.17 ± 1.55
20	35 ± 1.93	29 ± 1.60
30	48 ± 2.65	40 ± 2.21
40	62 ± 3.42	58 ± 3.20
50	85 ± 4.69	80.6 ± 4.45

Values are mean ± SE of triplicate determinations.

The DPPH assay is used to determine antioxidant potential of natural compounds. It is reduced from a purple compound to a light yellow compound by electrons from oxidant compounds. Reaction of DPPH with hydroxyl groups involves a homolytic substitution of one of the phenyl rings of DPPH yielding 2-(4-hydroxyphenyl)-2-phenyl-1-picryl hydrazine as a major product. The concentration of DPPH at the end of a reaction will depend on the concentration and structure of the compound being scavenged [9–11]. Thus, the ability of the test samples to quench this radical is a measure of its antioxidative ability.

Total phenolics constitute one of the major groups of compounds acting as primary antioxidants or free radical terminators hence it was reasonable to detect their amount in the herbal preparation. Strong antioxidant activity of the *Phyllanthus amarus* was found which was nearly same when compared to ascorbic acid as standard. Plant exhibited antioxidant activity by inactivating lipid free radicals or preventing decomposition of hydroperoxides into free radicals [12]. The plant exhibited anti-diabetic, anti-cancer, anti-inflammatory properties and several other activities [13, 14]. The occurrence of alkaloids, flavonoids, hydrolysable tannins, lignans, phenolics and polyphenols in the extract may be responsible for antioxidative action in biological system, acting as scavengers of singlet oxygen and free radicals. The beneficial effects derived from phenolic compounds can be attributed to their antioxidant activity. This is also supported by the findings of other authors who worked on *Tephrosia purpurea* L., *Viscum album*, *Caesalpinia pulcherrima* and *Crocus sativus* [15–17].

CONCLUSION

This data provides a scientific explanation of presence of potent antioxidant potential of *Phyllanthus amarus*, which will be helpful in use of this plant for medicinal purpose globally.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are grateful to Jiwaji University for providing lab facility and UGC for financial assistance.

REFERENCES

1. Parmar S., Patel P.M. Pharmacognostic, Physicochemical and Phytochemical Study of *Phyllanthus Amarus* present in Some Appetizer Polyherbal formulations // American Journal of Pharm. Tech. Research. 2013. V. 3. № 1. P. 2249–3387.
2. Nair R.R., Abraham R.S. Integrating the Science of Pharmacology and Bio Informatics *Phyllanthus* «The wonder plant»

// Advanced Biology and Technology. 2008. V. 6. № 7. P. 28–30.

3. Sarin B., Verma N., Pedro M.J., Mohanty A. An Overview of Important Ethnomedicinal Herbs of *Phyllanthus* Species: Present Status and Future Prospects // The Scientific World Journal. 2014. №12. P. 839172.
4. Ahmed W., Huygens F., Goonetilleke A., Gardner T. Real-time PCR detection of pathogenic microorganisms in roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia // Applied and Environmental Microbiology. 2008. № 74. P. 5490–5496.
5. Blois M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical // Biochimica et Biophysica Acta. 1955. № 18. P. 165.
6. Ruch R.J., Cheng S.J., Klaunig J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea // Carcinogenesis. 1989. № 10. P. 1003–1008.
7. Slinkard K., Singleton V.L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. American Journal Enology Viticulture. 1977. № 28. P. 49–55
8. Sen A., Batra A. The study of in vitro and in vivo antioxidant activity and total phenolic content of *Phyllanthus amarus* Schum Thonn: A medicinally important plant // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2013. № 5. P. 947.
9. Verma M., Friedl M.A., Richardson A.D., Kiely G., Cescatti A., Law B.E., Wohlfahrt G., Gielen B., Rounsard O., Moors E.J., Toscano P., Vaccari F.P., Gianelle D., Bohrer G., Varlagin A., Buchmann N., Gorsel E.V., Montagnani L., Propastin P. Remote sensing of annual terrestrial gross primary productivity from MODIS: an assessment using the FLUXNET La Thuile data set // Biogeosciences. 2014. № 11. P. 2185–2200.
10. Qureshi M.N., Kuchekar B.S., Logade N.A., Haleem M.A. In vitro antioxidant and in-vivo hepatoprotective activity of *Lecucis ciliata* leaves // Records of Natural Products. 2010. № 4. P. 124–130.
11. Masoko P., Eloff J.N. Screening of 24 South African Combretum and Terminalia (Combretaceae) species for antioxidant activities, African Journal of Traditional // Complementary and Alternative medicines. 2007. № 4. P. 231–239.
12. Pitchaon M., Suttajit M., Pongsawatmani R. Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some Thai indigenous plants // Food Chemistry. 2007. № 100. P. 1409–1418.
13. Poh-Hwa T., Yoke-Kqueen C., Indu Bala J. Son R. Bioprotective properties of three Malaysia *Phyllanthus* species: An investigation of the antioxidant and antimicrobial activities // International Food Research Journal. 2011. V. 18. № 3. P. 887–893.
14. Bankole H.A., Magbagbeola O.A. Adu O.B., Fatai A.A., James B.A. Biochemical effect of ethanolic extract of *Phyllanthus amarus* (Euphorbiaceae) on plasma nitric oxide and penile cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in mature male guinea pigs // Asian Journal of Biochemistry. 2011. № 6. P. 291–299.
15. Asaduzzaman M.D., Kinoshit S., Bhuiyan S.S., Asakaw S., Watabe S. Stimulatory and inhibitory mechanisms of slow muscle-specific myosin heavy chain gene expression in fish: Transient and transgenic analysis of torafugu MYHM86-2 promoter in zebrafish embryos // Experimental Cell Research. 2013. V. 319. № 6. P. 820–837.
16. Patel G., Patel S., Prajapati D., Mehta R. RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Amlodipine Besylate and Hydrochlorothiazide in Combined Dosage Forms // Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences. 2010. V. 3. № 1. P. 49–53.
17. Sengul M., Yildiz H., Gungor N., Cetin B., Eser Z., Ercisli S. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants // Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2009. V. 22. № 1. P. 102–106.

Поступила 18 октября 2015 г.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ *PHYLLANTHUS AMARUS IN VITRO*

© Коллектив авторов, 2016

Нилу Синха

Ph.D., Сателлитный центр Института микроэлементов ЮНЕСКО, Школа зоологических исследований, Лаборатория биологии размножения, Университет Дживаджи, Гвалиор, Индия

Амита Джасвал

Ph.D., Сателлитный центр Института микроэлементов ЮНЕСКО, Школа зоологических исследований, Лаборатория биологии размножения, Университет Дживаджи, Гвалиор, Индия

Садхана Шривастава

Ph.D., Сателлитный центр Института микроэлементов ЮНЕСКО, Школа зоологических исследований, Лаборатория биологии размножения, Университет Дживаджи, Гвалиор, Индия

Мохедрин Салим Решши

Ph.D., Сателлитный центр Института микроэлементов ЮНЕСКО, Школа зоологических исследований, Лаборатория биологии размножения, Университет Дживаджи, Гвалиор, Индия

Чхави Утра

Ph.D., Сателлитный центр Института микроэлементов ЮНЕСКО, Школа зоологических исследований, Лаборатория биологии размножения, Университет Дживаджи, Гвалиор, Индия

Сангита Шукла

Ph.D., Сателлитный центр Института микроэлементов ЮНЕСКО, Школа зоологических исследований, Лаборатория биологии размножения, Университет Дживаджи, Гвалиор, Индия
E-mail: profsshukla@gmail.com, neel236@gmail.com

Из-за многочисленных побочных эффектов при приеме антибиотиков, включая гиперчувствительность, подавление иммунитета и аллергические реакции, в настоящее время большое внимание уделяется растительным экстрактам, которые содержат биологически активные соединения, используемые в традиционной фитотерапии.

Индия – страна, имеющая очень долгую и непрерывную историю использования многих травяных препаратов в официально признанных альтернативных системах здравоохранения, таких как Аюрведа, Унани, Сиддха, Гомеопатия и Натуропатия.

Phyllanthus amarus широко распространен в тропиках и субтропиках, в песчаных районах, растет как сорняк в южной Флориде, Багамских островах, Вест-Индии и тропической Америке. Эта трава находит свое применение во всем мире для лечения проблем желудка, мочевого пузыря, печени, почек и селезенки, используется для лечения желтухи, диареи, дизентерии, лихорадки, для заживления язв и ран.

Исследование и использование антиоксидантных свойств растений стало незаменимым для научных исследований и промышленных целей. Растения являются источниками полифенолов, флавоноидов и фенольных соединений, которые вносят свой вклад в защиту клеток и тканей против вредного воздействия активных форм кислорода (АФК) и других свободных радикалов. При низких или умеренных концентрациях АФК, как правило, оказывают благоприятное воздействие на клеточные реакции и иммунную систему, при высоких – могут привести к повреждению клеточных структур, в том числе липидов, белков и ДНК. Человеческий организм имеет несколько механизмов противодействия окислительному стрессу, производя антиоксиданты внутри тела или через продукты питания.

В настоящем исследовании определяли общее содержание фенольных соединений (ФС), а антиоксидантную активность водно-спиртового экстракта *Phyllanthus amarus* оценивали по реакции ингибирования 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) и перекиси водорода.

1. Определение активности свободных радикалов проводили с использованием ДФПГ в методе Блуа. 0,1 мМ раствора красителя ДФПГ в этаноле прибавляли к водно-спиртовым экстрактам филантуса при различных концентрациях. Витамин С использовали в качестве стандарта в той же концентрации. Смесь энергично встряхивали и оставляли при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем измеряли спектрофотометром оптическую плотность при 517 нм.

2. Пероксидазную активность водных экстрактов *Phyllanthus amarus* определяли с использованием метода Руха. Образцы с различной концентрацией водно-спиртовых экстрактов филантуса в фосфатном буфере (pH 7,4) смешивали с 0,6 мл 43 мМ перекиси водорода и через 10 мин измеряли оптическую плотность при 230 нм. Смесь без образца использовали в качестве контроля.

3. Общее содержание фенольных соединений определяли методом Фолина–Дениса: к водно-спиртовому экстракту филантуса добавляли реактив Фолина–Дениса, Na_2CO_3 , затем полученную смесь инкубировали в течение 2 ч. Спектр поглощения всех образцов измеряли при 765 нм.

Для оценки антиоксидантной активности природных соединений широко используется ДФПГ-анализ в качестве свободного радикала. Максимальный процент антиоксидантной активности проявили водно-спиртовые экстракты филантуса при концентрации 50 мкг/мл путем ингибирования ДФПГ (75,9%). Аскорбиновая кислота, в качестве стандарта показала примерно 88,3% ингибирования ДФПГ-радикалов в 50 мкг/мл. Водно-спиртовые экстракты филантуса в концентрации 50 мкг/мл продемонстрировали пероксидазную (H_2O_2) активность 80,6%, что сравнимо с аскорбиновой кислотой. Содержание суммы фенольных соединений в образцах водно-спиртовых экстрактов филантуса – 430 мг, т.е. водно-спиртовые экстракты филантуса показали значительную антиоксидантную активность.

Полученные данные научно обосновывают наличие мощного антиоксидантного эффекта *Phyllanthus amarus*, что обуславливает применение этого растения в лечебных целях во всем мире.

Ключевые слова: антиоксидант, *Phyllanthus amarus*, DPPH, H_2O_2 .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ В ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ. ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ. ЧАСТЬ I. ИЗУЧЕНИЕ СЕКРЕТОРНОЙ ФУНКЦИИ ЖЕЛУДКА; ОЦЕНКА ЯЗВЕННЫХ ПОРАЖЕНИЙ

А.И. Багинская

к.м.н., Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Е.В. Ферубко

к.м.н., зав. отделом экспериментальной и клинической фармакологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: ekaterina-ferubko@rambler.ru

Е.Н. Курманова

науч. сотрудник, отдел экспериментальной и клинической фармакологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

И.В. Воскобойникова

к.фарм.н., вед. науч. сотрудник, отдел экспериментальной и клинической фармакологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

В.К. Колхир

д.м.н., гл. науч. сотрудник, отдел экспериментальной и клинической фармакологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Представлен отечественный и зарубежный опыт проведения скрининговых и доклинических исследований потенциальных гастропротективных биологически активных веществ (БАВ). Предложены наиболее рациональные методические подходы к поиску и разработке БАВ для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта с использованием моделей эрозивно-язвенных поражений желудка и двенадцатиперстной кишки.

Ключевые слова: экспериментальные модели язв желудка и двенадцатиперстной кишки, язвенная активность, гастропротекторное действие.

На сегодняшний день рынок лекарственных препаратов с доказанной противоязвенной активностью превышает 500 наименований, тем не менее проблема эффективной терапии этой патологии далека от своего разрешения [1].

Ведущими направлениями лекарственной терапии язвенного процесса остаются нормализация кислотно-пептического фактора желудочной секреции, стимуляция защитных механизмов слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта к повреждающему действию экзогенных и эндогенных факторов – цитопротективное действие, а также стимуляция регенеративных процессов для ускорения заживления язвенного дефекта. Задача поиска эффективных противоязвенных средств в указанных направлениях продолжает оставаться актуальной.

Чтобы определить и с большей достоверностью охарактеризовать свойства и механизм действия исследуемого потенциального противоязвенного средства, разработано довольно большое коли-

чество экспериментальных моделей язвы желудка и двенадцатиперстной кишки (мыши, крысы, морские свинки, кролики, собаки, собаки бигли и др.), различающихся по способу воспроизведения (вид язвенного) и механизму развития патологического процесса. Кроме того, по скорости развития язвенных дефектов слизистой оболочки, длительности их спонтанного заживления экспериментальные модели условно делят на «острые», «субхронические» и «хронические», что позволяет проводить скрининговые (поиск) и длительные наблюдения за клиникой хронического процесса при разработке потенциального препарата.

В доступной литературе за последние 50–60 лет не появлялось руководства, в котором обобщены и систематизированы методы, используемые для воспроизведения эрозивно-язвенных поражений желудка и двенадцатиперстной кишки в эксперименте.

Данные практические рекомендации являются единственным современным пособием, в кото-

матической системы обработки. Результаты представлены в табл. 2.

В испытуемом растворе из НГМ *P. crispum* идентифицировано 38 веществ природного происхождения. Основными компонентами пробы являются этиловые эфиры 9-*цис*,11-*транс*-октадекадиеновой и линоленовой кислот (18,38 и 17,34% соответственно), полученные этилированием жирных кислот при хранении настойки, 3,7,11,15-тетраметил-2-гексадецен-1-ол (12,15%), миристи-

цин (5,19%), *цис*-1-этилиденоктагидро-7а-метил-1Н-инден (4,80%) и апиол (3,25%). Найдены также соединения терпенового ряда *цис*-п-мента-2,8-диен-1-ол, можжевельная камфора, β-фелландрен, изоаромадендрен эпоксид, углеводороды гексадецен, генейкозан, докозан, эйкозен, трикозен, тетракозан, фитол, фалкаринол, свободная олеиновая кислота, эфиры жирных кислот (в том числе циклопропилсодержащей), кумарины изобергаптен и изопимпенеллин.

Таблица 2. Содержание летучих компонентов в НГМ *P. crispum*

№	Время удерживания, мин	Название вещества	Площадь пика	Содержание, %
1	2	3	4	5
1	3,502	о-Ксилол	25099	0,26
2	3,11	Нонилацетат	112948	1,17
3	3,961	Неизвестное	15154	0,16
4	4,392	Неизвестное	15031	0,16
5	4,49	Неизвестное	16637	0,17
6	5,029	β-Фелландрен	9804	0,10
7	5,606	α-п-Диметилстирен (дегидро-п-цимен)	8289	0,09
8	5,685	Неизвестное	11116	0,12
9	6,027	Неизвестное	5163	0,05
10	6,318	Неизвестное	4514	0,05
11	6,457	<i>Цис</i> -п-мента-2,8-диен-1-ол	34034	0,35
12	6,558	Неизвестное	9267	0,10
13	6,628	Гексадецен (C16)	8109	0,08
14	6,711	Генейкозан (C21)	3645	0,04
15	6,816	Неизвестное	16658	0,17
16	6,967	Неизвестное	9694	0,10
17	7,03	Неизвестное	11157	0,12
18	7,237	Неизвестное	13632	0,14
19	7,42	Неизвестное	9471	0,10
20	7,504	Неизвестное	35560	0,37
21	7,844	Докозан (C22)	10826	0,11
22	8,076	Z-8-метил-9-тетрадекановая кислота (C15:0)	107170	1,11
23	8,148	2-Гексил-1-октанол	172867	1,79
24	8,426	Метил-(2-гидрокси-3-этокси-бензил)-эфир	38339	0,40
25	8,534	Неизвестное	21085	0,22
26	8,715	Неизвестное	96257	1,00

ром представлен обобщенный отечественный (в том числе собственный) и зарубежный опыты проведения скрининговых и доклинических исследований потенциальных противоязвенных (гастропротективных) биологически активных веществ (БАВ). Предлагаются наиболее рациональные методические подходы к поиску и разработке БАВ (как природного, так и синтетического происхождения) для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта с использованием моделей эрозивно-язвенных поражений желудка и двенадцатиперстной кишки, отражающих основные этиопатогенетические факторы язвообразования. При этом учитывались основные требования, предъявляемые к скрининговому и доклиническому исследованию лекарственных веществ: быстрота получения результатов, их достоверность и минимум материальных затрат.

Язвенная болезнь – хроническое, циклически протекающее заболевание с разнообразной клинической картиной, основным морфологическим проявлением которого является рецидивирующая язва желудка или двенадцатиперстной кишки, возникающая на фоне гастрита, вызванного инфекцией *Helicobacter pylori* [2]. Язвенная болезнь по распространенности, тяжести течения, осложнениям и смертности занимает ведущее место среди заболеваний желудочно-кишечного тракта. В России язвенной болезнью страдает, по различным данным, от 5 до 15% (в среднем, около 10%) взрослого населения [1].

Патогенез язвенной болезни достаточно сложен и во многом не совсем ясен. Генетическая предрасположенность, нарушение равновесия между факторами агрессии и защиты, наличие *H. pylori* (патогенетическая роль НР в развитии и хронизации язвы в настоящее время является общепризнанной) – три основных фактора, которые рассматриваются в настоящее время как основные для появления и рецидивирования язвенной болезни [3]. У здоровых людей слизистая оболочка желудка резистентна к постоянному воздействию соляной кислоты и пепсина, что достигается хорошо известными цитопротективными механизмами, обеспечиваемыми простагландинами (ПГ), которые присутствуют в желудочном соке здоровых людей. Цитопротекция – способность слизистой оболочки предохранять клетки эпителия от гибели. Среди факторов агрессии, повреждающих клетки эпителия, следует учитывать: стресс, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), HCl, пепсин, желчь, ишемию и *H. pylori*. Поверхно-

стному эпителию слизистой оболочки принадлежит ведущая роль в цитопротекции, так как он мало проницаем для H^+ вследствие постоянно продуцируемых им бикарбонатов (ионов HCO_3), поступающих в слизь. Слизь, секретлируемая поверхностным эпителием, состоит из двух слоев: один легко удаляется при пищеварении, другой (прикрепленная слизь) несет основную защитную функцию. Этот слой состоит из муцинов, фосфолипидов, трефойловых пептидов. Способствуют цитопротекции интенсивное клеточное обновление, высокий уровень васкуляризации, оксид азота, секреция защитных молекул (ПГ, эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий фактор роста альфа (TGF- α)) [4].

Репаративную регенерацию гастродуоденальных язв регулируют многие факторы роста. Основным считается эпидермальный фактор роста (ЭФР), обладающий многими свойствами, необходимыми для обеспечения высокого качества заживления. Он ингибирует секрецию HCl, предохраняет слизистую оболочку от острых повреждений и обеспечивает ее адаптацию при повреждениях желудка, стимулирует синтез ДНК и протеинов, ускоряет пролиферацию и миграцию эпителия. Многочисленными исследованиями установлено, что основные патогенетические механизмы развития язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки различны. Язвенное поражение двенадцатиперстной кишки возникает на фоне гипертонуса блуждающего нерва, ведущего к агрессии чрезвычайно кислого, богатого протеолитическими ферментами желудочного сока, который выделяется в большом количестве даже в межпищеварительные фазы [5]. При этом в результате тесных генетических и анатомических связей и нарушений кортико-висцеральных взаимоотношений при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки в патологический процесс вовлекаются гепатобилиарная система, поджелудочная железа и тонкая кишка. Подтверждением этому является возникновение у 70–87% таких больных дискинезии печени и желчных путей, в результате чего развивается длительный застой желчи в пузыре и желчных путях.

Из трех вышеперечисленных причин развития язвенной болезни наиболее важная – нарушение баланса между агрессивными факторами содержимого просвета верхних отделов желудочно-кишечного тракта и защитными цитопротективными факторами, обеспечивающими поддержание целостности и нормального функционирования

слизистой оболочки. Это и является по современным представлениям ведущим звеном в патогенезе язвенной болезни [6]. В частности, возникает пептическая язва, когда превалирует усиленное образование и проникновение агрессивных ulcerогенных факторов (желудочный сок, соляная кислота, пепсин) в просвет двенадцатиперстной кишки над защитными механизмами слизистой оболочки желудка (слизь, щелочная секреция, микроциркуляция, репаративная регенерация эпителия слизистой оболочки) [7].

Кроме того, в патогенезе язвенной болезни и ее рецидивов большое значение имеют нарушения нервной регуляции, стресс [8], которые могут проявляться признаками ваготонии, соляралгии, невротических состояний и др. и оказывать влияние на клинические проявления заболевания, активность ulcerозного процесса и функции желудка, а также изменения в эндокринной регуляции и обмене биогенных аминов, выполняющих роль медиаторов [8]. Отмечаются разнообразные сбои со стороны иммунной системы организма: повышается количество бластных и трансформированных лимфоцитов, увеличивается содержание флуоресцирующих продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови, что свидетельствует об усилении свободно-радикального окисления липидов, и др. [9].

Нарушение этих механизмов диктует разработку и создание препаратов, способствующих уменьшению повреждающего воздействия желудочного содержимого и/или повышению резистентности контактирующих с ним тканей. Для подавления кислотно-пептических факторов применяются препараты, снижающие кислотность среды в желудке, а для активизации цитозащитных механизмов – препараты, увеличивающие способность слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки противостоять действию кислоты и пепсина. Одни препараты могут снижать выделение желудочного сока и пепсиногена (антагонисты H_2 -рецепторов – циметидин, ранитидин, фамотидин), а другие оказывают нейтрализующее воздействие на уже выделенную кислоту (антациды): сукральфат, де-нол, диосмектит и др. [10].

Однако значительно большее внимание уделяется изучению медикаментозных препаратов – цитопротекторов (гастал, сукральфат, висмут трикалия дицитрат, простагландины), действие которых способствует или приводит к усилению местных факторов защиты [6] поверхности язвы от кислотно-пептического воздействия и к ее рубцева-

нию [11]. В этом плане, например, интерес представляют простагландины (цитопротективные «местные гормоны» в слизистой оболочке желудка), нарушение синтеза которых играет существенную роль в патогенезе язвенной болезни. Простагландины, эпидермальный фактор роста и соматостатин регулируют клеточный метаболизм, повышают резистентность клеток к повреждению, стимулируют слизеобразование и секрецию бикарбонатов, обеспечивающих пристеночную нейтрализацию H^+ ионов способностью тормозить секрецию желудочного сока, выделение соляной кислоты и пепсина [2], непосредственно влияя на обкладочные клетки и одновременно подавляя освобождение гастрина. И сегодня нет ни одного другого заболевания, для лечения которого было бы предложено большое число лекарств и не лекарственных методов лечения, что можно объяснить, с одной стороны, стремлением воздействовать на известные этиологические факторы и звенья патогенеза язвенной болезни, с другой стороны, недостаточной их эффективностью [12].

В свете вышесказанного, в зависимости от механизма действия противоязвенные препараты могут быть разделены на следующие группы [10, 13, 31]:

I. *Препараты, нейтрализующие желудочный сок*: антациды: активированный уголь, алмагель, висмута трикалия дицитрат (де-нол), сукральфат, маалокс, гастал, лансопразол, диосмект.

II. *Препараты, блокирующие рецепторы париетальных клеток*: блокаторы H_2 -рецепторов: циметидин, ранитидин (синонимы: ранисан, улкодин), фамотидин; блокаторы мускариновых рецепторов: пирензепин, антихолинэргики; блокаторы гастриновых рецепторов: проглумид.

III. *Депрессоры секреции желудочного сока (ингибиторы протонной помпы)*: омепразол и его аналоги – пантопразол (санпраз), эзомепразол (моноизомер омепразола) и др.

IV. *Цитопротекторы*: простагландины, сукральфат, мизопростол, висмута трикалия дицитрат (де-нол), целекоксиб, магалдрат, солкосерил, деринат, пирензепин, метилурацил, алоэ и др.

V. *Эрадикаторы H. pylori*: лансопразол, ингибиторы протонной помпы, ультоп и др.

VI. *Иммуномодуляторы*: ультоп, панавир.

VII. *Препараты, оказывающие воздействие на ЦНС*: сульпирид, седативные средства.

VIII. *Фитопрепараты, обладающие гастропротективной активностью*: аллантон, калефлон, ротокан, беллацехол.

Приведенный неполный список применяющихся в настоящее время противоязвенных средств подтверждает не только многообразие этиопатогенетических факторов в развитии язвенного процесса, но и затрудняет формулировку унитарной теории его возникновения и развития, а следовательно, разработку единой экспериментальной модели, воспроизводящей данную патологию и максимально отражающей основные особенности заболевания. Вследствие этого для возможности с большей достоверностью охарактеризовать свойства и механизм действия исследуемого потенциального противоязвенного средства, а также область возможного применения, его изучение проводят на различных экспериментальных моделях острой, подострой или хронической язвы желудка и двенадцатиперстной кишки.

Экспериментальные язвы желудка и двенадцатиперстной кишки воспроизводят введением ulcerогенных веществ (химических или лекарственных препаратов) с различным механизмом нарушения целостности слизистой оболочки, механическим повреждением слизистой или хирургическим вмешательством, например, для создания гастродуоденальной патологии с целью регургитации пищеварительного сока двенадцатиперстной кишки в желудок.

Экспериментальные исследования должны осуществляться согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.) и Федеральному Закону о защите животных от жестокого обращения от 01.01.1997 г., с соблюдением конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой Европейским Союзом в 1986 г., и Директивы 86/609 ЕЭС, основанной на тексте этого соглашения «*Dr. Robert Hubrecht, Current EU Legislation Controlling Animal Experiments*» (Страсбург, 18.03.86 г.).

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СЕКРЕТОРНОЙ ФУНКЦИИ ЖЕЛУДКА У ЖИВОТНЫХ

Секреторная и двигательная функции желудка являются основными в его деятельности и тесно взаимосвязаны друг с другом. Нормальный ритм эвакуации содержимого желудка в двенадцатиперстную кишку является одним из определяющих факторов регуляции секреции ферментов, соляной кислоты и гастродуоденальных гормонов. В условиях патологии (гастрит, язвенная болезнь, эн-

тероколит и др.) происходит «поломка» нормальной регуляции секреторной и двигательной функций желудка, что сопровождается патологической эвакуацией кислого желудочного содержимого в луковицу двенадцатиперстной кишки.

Как известно, действие, например, антацидных средств обусловлено или нейтрализацией соляной кислоты желудочного сока (опыты *in vitro*), или торможением секреции. При изучении влияния такого типа веществ на секреторную функцию желудка проводят их тестирование в острых и хронических опытах на крысах и морских свинках в сравнении с антацидной активностью таких популярных соединений как блокаторы H_2 -рецепторов типа ранитидина и блокаторов «протонного насоса» (омепразол, эзомепразол, пантопразол и др.) [14]. Влияние соединений на базальную и стимулированную секрецию изучают на крысах по методу *Shay* [15], который позволяет определить основные показатели секреции – объем, кислотность и пептическую активность. Стимуляцию секреции и кислотообразующей функции обкладочных клеток желудка осуществляют подкожным введением гистамина (2,5 мг/кг), карбахолина (0,25 мг/кг) и пентагастрина (0,2 мг/кг). Использование в качестве стимуляторов желудочной секреции карбахолина и гистамина позволяет моделировать разные фазы желудочного пищеварения (сложнорефлекторную и химическую). Методы исследования кислотообразующей, ферментообразующей функции желудка у животных, количественное определение пепсина подробно описаны *Е.В. Краевским* [16].

Изучение секреторной функции желудка в условиях хронического опыта можно проводить на крысах, морских свинках с фистулой желудка. Причем морская свинка является более удобной моделью, так как желудочная фистула никогда у них не выпадает. Животные с ней живут неограниченное время. Получаемый натошачовый сок, как правило, чист, а его количество, получаемое за один час, в 7–10 раз больше, чем у крысы. Для изучения секреторной деятельности желудка у крыс в хроническом эксперименте *И.Б. Куваева, Л.С. Басалык* [17] предложили использовать изготовленную ими фистулу из органического стекла. Время «работы» крыс с фистулой желудка 3–6 мес., некоторые животные могут жить больше года.

На заключительном этапе фармакологического изучения, например, антацидных средств проводят исследования на собаках с фистулой желудка по *В.А. Басову* [18]. Секрецию стимулируют подкож-

ным введением гистамина (0,04 мг/кг) и пентагастрина (0,004 мг/кг). Подробно методические подходы при проведении исследований в этом направлении описаны в литературе [14, 19].

Опыт показывает, что в начале исследований целесообразно использовать экспериментальную модель, которая позволяет выявить влияние изучаемых веществ на основные звенья процессов, участвующих в патогенезе язвенной болезни – секрецию соляной кислоты и нарушение защитного барьера слизистой оболочки желудка. С этой целью для изучения базальной и стимулированной секреции многие исследователи применяют метод лигатурования пилоруса у крыс по *Shay* [15]. Данный метод позволяет определить, во-первых, влияние вещества на основные показатели секреции – объем, кислотность и пептическую активность, во-вторых, наличие или отсутствие дефектов слизистой оболочки (противоязвенное действие).

Определение желудочной секреции и кислотности желудочного сока у крыс

1. Методы: *S. Dai, K. Shay, O. Yamamoto*.

Белых крыс массой 150–250 г [15] обоих полов за 24 ч до опыта лишают пищи, оставляя свободный доступ к воде.

1а. Метод сбора желудочного сока у бодрствующих крыс, разработанный *S. Dai* и *C.W. Ogle*.

Под легкой эфирной анестезией животных фиксируют к станку, вскрывают брюшную полость, на пилорический отдел желудка накладывают петлю из нержавеющей стали, концы которой выводят наружу. После полного выздоровления (7–10-й послеоперационный день) крыс оставляют без пищи в течение 48 ч со свободным доступом к питью (8%-ная сахароза в 0,2%-ном растворе NaCl), которое убирают за час до эксперимента. Перед началом эксперимента животных, находящихся в состоянии бодрствования, взвешивают, затем затягивают петлю и возвращают в индивидуальные, ограничивающие движения клетки на 2 ч. В конце эксперимента крыс умерщвляют передозировкой эфира, извлекают желудки, сок сливают в пробирки для измерения объема и определения общей кислотности, а слизистую оболочку желудков исследуют на предмет геморрагических повреждений. Авторы считают, что их метод более физиологичен, чем метод *Shay*, так как не связан с наркотизацией животных и у них отмечается меньшее количество эрозивных повреждений слизистой оболочки, нарушающих сбор сока.

1б. *Оперирование животных по Shay*.

Берут на лигатуры пищевод и пилорус [15, 19], делают надрез стенки пищевода, вставляют в полость пищевода катетер, промывают желудок физиологическим раствором и затем перевязывают пищевод и пилорус. Исследуемое вещество вводят внутривенно или интрадуоденально. При пероральном введении вещество вводят за час до наложения лигатуры. Гистамин в дозе 2,5 мг/кг вводят подкожно, затем брюшную полость послойно зашивают. Через 5 или 14 ч крыс умерщвляют передозировкой эфира, извлекают желудки, сливают желудочный сок каждой крысы в мерную пробирку, измеряют его объем, центрифугируют (3000 об/мин, в течение 10 мин). Концентрацию кислоты определяют титрованием 0,1н. NaOH до pH 7,0. Активность пепсина определяют методом Ансон в модификации *М.П. Черникова*, используя бычий альбумин в качестве субстрата [20]. Активность кислоты и пепсина выражают в мкг/ч и мг/ч соответственно.

2. Метод *H. Saton* [21].

Исследования проводят на старых (7 недель) крысах-самцах массой 190–230 г, которых лишают пищи на 24 ч. Вода без ограничения.

2а. Секреция желудочного сока у крыс с перевязанным привратником.

Под легкой эфирной анестезией у крыс вскрывают брюшную полость, накладывают лигатуру на пилорус. Исследуемый препарат, растворитель вводят интрадуоденально сразу после лигации пилоруса и брюшную полость зашивают. Через 3 ч животных забивают передозировкой эфира, вскрывают брюшную полость, извлекают желудки и сливают желудочный сок в мерные центрифужные пробирки, измеряют его объем у каждой крысы отдельно и центрифугируют сок при 3000 об/мин 10 мин. Концентрацию кислоты определяют автоматической титрацией при pH 7,0 с 0,1н. NaOH и высчитывают общую кислотность за трехчасовой период.

2б. Секреция желудочного сока у анестезированных крыс.

У анестезированных уретаном (1,2 г/кг в/б) крыс вскрывают по средней линии брюшную полость, извлекают желудок и накладывают лигатуру на пилорус, препарат и его растворитель вводят интрадуоденально сразу после лигации пилоруса, желудок возвращают на место и брюшную полость зашивают. Через 30 мин всем животным для

стимулирования секреции вводят подкожно гистамин (30 мг/кг). Забивают крыс через 3 ч, извлекают желудки, вскрывают их по большой кривизне и собирают желудочный сок. Общую кислотность определяют, как описано выше. Активность пепсина определяют несколько измененным методом Anson, используя в качестве субстрата бычий гемоглобин.

Для определения точного времени наступления торможения секреции желудочного сока после стимулирования гистамином измерения его количества проводят через 0,5, 2, 4, 8 и 24 ч после введения препарата внутрь.

ПОДГОТОВКА ЖИВОТНЫХ К ВОСПРОИЗВЕДЕНИЮ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЯЗВ ЖЕЛУДКА И ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ. МЕТОДЫ ПОДСЧЕТА ЯЗВЕННЫХ ДЕФЕКТОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ

Следующий этап после определения влияния на секреторную активность – изучение влияния исследуемого вещества на целостность слизистой оболочки желудка или двенадцатиперстной кишки на различных острых, субхронических или хронических экспериментальных моделях патологии. Ориентиром в подборе нужной модели могут служить результаты, полученные на *Shay* модели экспериментальных язв.

Противоязвенную активность веществ изучают на разных видах животных обоего пола: мышах, крысах, морских свинках, кроликах, собаках, собаках биглях и др., у которых воспроизводят различные по патогенезу модели язв желудка и двенадцатиперстной кишки: воздействием на структуры головного мозга; нарушением высшей нервной деятельности; чрезвычайными воздействиями на различные отделы периферической вегетативной нервной системы (как симпатической, так и парасимпатической), парэнтеральным введением ulcerогенных веществ (химических и лекарственных препаратов) с различным механизмом нарушения целостности слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, хирургическим вмешательством, нарушающим физиологический путь пищеварения [22] и др. Как правило, для проведения массовых серийных исследований изучаемых веществ чаще используют парэнтеральные способы воспроизведения патологии, а также более дешевых и доступных лабораторных животных – мышей, крыс, морских свинок.

По скорости развития язвенных дефектов, длительности спонтанного заживления их условно делят на «острые», «субхронические» и «хронические».

К «острым» моделям (длительностью примерно до трех дней) относят: стрессовые язвы, воспроизводимые иммобилизацией, электростимуляцией, охлаждением, перегрузкой плаванием, бегом, обескровливанием, голоданием и др.); язвы, воспроизводимые хирургическим вмешательством – наложением лигатуры на пилорус; язвы, воспроизводимые введением лекарственных препаратов и химических веществ: этанола, преднизолона, серотонина, гистамина, нестероидных противовоспалительных препаратов (аспирин, индометацин, бутадион), цистеамина, атофана.

К «субхроническим» моделям (длительностью до 20 дней) относят: язвы, воспроизводимые введением кофеиново-мышьяковистой смеси; лекарственных препаратов: резерпина, преднизолона, бутадиона (двенадцатидневная модель); язвы, воспроизводимые наложением зажимов Пеана на двенадцатиперстную кишку.

К «хроническим» моделям (длительностью до нескольких месяцев и года) относят: язвы, воспроизводимые введением химических веществ (уксусная кислота, цистеамин, атофан) и др.; язвы, воспроизводимые криогенным методом; язвы, воспроизводимые хирургическим вмешательством, нарушающим физиологический путь пищеварения (еюногастральный анастомоз с целью регургитации пищеварительного сока двенадцатиперстной кишки в желудок) и др.

Изучаемые вещества (минимум в двух дозах) вводят животным внутрижелудочно, внутрибрюшинно, подкожно, внутримышечно, в зависимости от используемой модели, химической структуры, длительности эксперимента. Перед проведением экспериментов, в зависимости от используемой экспериментальной модели, животных лишают пищи (в основном, на 24, 36, 48 ч), оставляя свободный доступ к воде. В день проведения эксперимента животных распределяют на необходимое число групп по 10 особей (минимум – 6), в число которых входит контрольная группа и группа животных для препарата сравнения. Если предполагается большой процент гибели животных от применяемого ulcerогенного агента, то в группы может быть включено и большее число особей. Для проведения массовых скрининговых исследований используют «острые модели язв», воспроиз-

водимые парэнтеральными способами введения ульцерогенов.

Животных, погибших до окончания эксперимента, не учитывают.

После окончания эксперимента животных умерщвляют методом кранио-цервикальной дислокации (мыши), передозировкой эфира, ингаляцией в CO₂-камере и другими способами.

Желудок и двенадцатиперстную кишку (околопилорическую часть длиной 6–7 см) извлекают из брюшной полости, разрезают их по большой или малой кривизне, промывают физиологическим раствором и проводят макроскопическую визуальную оценку состояния слизистой оболочки: учитывают количество эрозий, язв (отдельно учитывают пенетрирующие и перфорирующие язвы) и градируют их по величине и площади.

Площадь у дефектов округлой формы измеряют (условно) по большому диаметру, в случае неправильной формы – измеряют длину и ширину. Определение площади язвенных дефектов дает дополнительную информацию о получаемых результатах, так как количественный показатель не всегда отражает существо процесса [23]. Используют различные варианты измерения размера язвенных дефектов в слизистой оболочке желудка и двенадцатиперстной кишке. Так, при измерении повреждений слизистой оболочки желудка, используют шкалу повреждений в миллиметрах, или в баллах (в основном, для измерения дефектов в слизистой двенадцатиперстной кишки). Например:

у мышей эрозии желудка подразделяют на мелкие, средние (диаметром 0,5 мм), крупные (протяженностью 1,5–2 мм) [24];

у крыс в случае петехий для подсчета их объединяют в общее количество, равное 1 мм; эрозии: мелкие – до 1,5 мм, средние – от 1,5 до 2,5 мм, крупные – > 2,5 мм и полосовидные (если протяженность более 5 мм, их делят на фрагменты длиной по 5 мм и учитывают как отдельные повреждения); по В.Н. Шаталову [25] – эрозии (независимо от их количества) – 1 балл; наличие одной язвы – 2 балла, двух язв и более – 3 балла; наличие прободных и пенетрирующих язв – 4 балла; по F.J. Minano [26] градиацию язвенных дефектов слизистой проводят по шкале от 0 до 5: 0 – нет язв; 1 – гиперемированная или геморрагическая слизистая; 2 – не более, чем 5 маленьких язв, $d < 3$ мм; 3 – много маленьких язв, $d > 3$ мм; 4 – много больших язв; 5 – прободная язва.

Градиация дефектов в слизистой оболочке двенадцатиперстной кишки в баллах: по Szabo с соавт.: 0 – нет язв; 1 – поверхностные эрозии в слизистой оболочке; 2 – глубокие язвы с трансмуральным некрозом; 3 – перфорированные язвы; по Keshavarzian с соавт. [27]: 0 – отсутствие дефекта; 2 – поверхностное повреждение слизистой оболочки кишки; 3 – язвенный дефект, занимающий всю толщину стенки двенадцатиперстной кишки; 4 – язва с перфорацией; по Futagawa с соавт.: 0 – нет повреждений; 1 – петехии; 2 – маркированные геморрагии; 3 – мелкие язвы; 4 – глубокие язвы; 5 – перфорированные язвы; по H. Ohno с соавт.: 0 – отсутствие повреждений; 1 – петехия; 2 – маркированное кровоизлияние; 3 – четкая язва; 4 – глубокая язва; 5 – перфорированная язва.

Площадь измеряют (условно) по большому диаметру у дефектов округлой формы. В случае дефекта неправильной формы измеряют длину большого и меньшего диаметров. Определение площади язвенных дефектов дает дополнительную информацию о получаемых результатах, так как количественный показатель не всегда отражает существо процесса [23].

Суммируют язвенные дефекты слизистой оболочки по следующей схеме: подсчитывают в каждой группе процент животных с язвенными дефектами, число и площадь дефектов. Средние показатели этих параметров служат для оценки терапевтической эффективности исследуемого вещества, которая характеризуется индексом Паулса [28] – это интегральный показатель соотношения числа язвенных дефектов в контрольной и опытной группах.

Индекс Паулса (X) рассчитывают по формуле:

$$X = A \times B / 100\%,$$

где А – среднее число язвенных дефектов или средняя площадь этих дефектов в данной группе; В – процент крыс с язвенными дефектами в группе.

Превышение величины индекса Паулса в контрольной группе над индексом Паулса в опытных группах до двух и более единиц свидетельствует о наличии у исследуемых веществ противоязвенной активности [1, 28, 29].

Кроме определения этих показателей О.Д. Барнаулов и А.К. Савельев [30] предлагают оценивать противоязвенный эффект по соотношению количества эрозий и язв на одно животное, т.е. удельного веса поражений различной тяжести (в процентах от общего числа поражений). Авторы считают, что

именно эти показатели позволяют обнаружить даже минимальное положительное влияние исследуемых веществ (например, холинолитиков) на трофику тканей желудка.

После визуальной градации поражений слизистых оболочек желудков животных, при необходимости, осуществляют гистологический контроль глубины и характера язвенных дефектов в контрольной и опытных группах. Для подтверждения воспроизводимости полученных результатов желательны повторение экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крылова С.Г. Растения Сибири и Дальнего Востока в терапии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (эксперим. исслед.): Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Томск. 2005. С. 3, 12, 23.
2. Широкова К.И. Язвенная болезнь // В кн.: Василенко В.Х., Гребнев А.Л. Болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. М.: Медицина. 1981. Гл. 6. С. 77–144.
3. Мишушкин О.Н., Зверков И.В., Володин Д.В., Балыкина В.В., Литвин А.А. Эффективность и место препарата панавир в лечении язвенной болезни // Эффективная фармакотерапия в гастроэнтерологии. 2009. № 2. С. 6–8.
4. Гребнев А.Л., Шептулин А.А. Язвенная болезнь. Методические рекомендации. Москва. 1995. Вып. 2. 99 с.
5. Попов В.А. Мембранное пищеварение при хирургической патологии. Ленинград. 1982. С. 92–93.
6. Логинов А.С., Амиров Н.Ш. О патогенезе язвенной болезни (обзор) // Новое в диагностике и лечении болезней желудка и двенадцатиперстной кишки. Сборник трудов ЦНИИГ. Москва. 1985. С. 5–15.
7. Nord K.S. Peptic ulcer disease in pediatric population // *Pediatr. Clin. N. Amer.* 1988. V. 35. P. 117.
8. Оболенцева Г.В. Фармакологическое изучение влияния некоторых природных и модифицированных полисахаридов на функции пищеварительной системы: Автореф. дисс. ... докт. 1984. С. 40.
9. Бульон В.В., Хныченко Л.К., Сапронов Н.С., Кузнецова Н.Н., Анискин В.Б., Ариненко Р.Ю., Коваленко А.Л., Алексеева Л.Е. Циклоферан в терапии язвы двенадцатиперстной кишки у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2001. Т. 64. № 6. С. 41–44.
10. Индометацин // Регистр лекарств. средств. Энциклопедия лекарств / Под ред. Г.Л. Вышковского. 2008. С. 357.
11. Семендяева М.Е., Алешина Т.В., Акулова Г.Л. Вентер и его место среди противоязвенных препаратов // Материалы симпозиума «Применение препарата Вентер (сукральфат) в лечении больных язвенной болезнью» / Под ред. А.С. Логинова. Москва. 1987. С. 32–34.
12. Логинов А.С., Аруин Л.И., Ильченко А.А. Язвенная болезнь и *Helicobacter pylori*. Новые аспекты патогенетической терапии. Москва. 1993. С.139–140.
13. Вичканова С.А., Колхир В.К., Сокольская Т.А., Воскобойникова И.В., Быков, В.А. Лекарственные средства из растений. М: АДРИС. 2009. 432 с.
14. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. Москва. 2000. С. 131–132.
15. Shay H., Komarov S. A., Fels S.S., Meranze D., Gruenstein M., Siple H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat // *Gastroenterology*. 1945. V. 5. P. 43–46.
16. Краевский Е.В. Современный метод исследования секреторной функции желудка // В кн.: Новые методы диагностики и лечения заболеваний органов пищеварения. 1970. Т. 92. С. 441–442.
17. Куваева И.Б., Бассалык Л.С. Изучение действия гастрина на желудочную секрецию у крыс в хроническом эксперименте // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1974. № 4. С. 78–81.
18. Павлов И.П. Оперативная методика изучения пищеварительных желез // Физиология пищеварения. Статьи, лекции, доклады. Москва. 1952. С. 344–354.
19. Yamamoto O., Okada Y., Okabe S. Effects of a proton pump inhibitor, omeprazole, on gastric and duodenal ulcers, or erosions in rats // *Dig. Dis. Sci.* 1984. V. 29. № 5. P. 394–401.
20. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина. 1987. С. 85–90.
21. Sato H., Inatomi N., Nagaya H., Inada I., Nohara A., Nakamura N., Maki Y. Antisecretory and antiulcer activities of a Nokin Proton Pump inhibitor Ag – 1749 in dogs and rats // *J. Pharmacol. and experiment. therapeutics*. 1989. V. 248. № 2. P. 806–815.
22. Kaminishi M., Sadatsuki H., Johjima Y., Oohara T., Kondo Y. A new model for production of chronic gastric ulcer by duodenogastric reflux in rats // *Gastroenterol.* 1987. V. 92. P. 1913–1918.
23. Акимов А.А. О сравнительном действии некоторых пиримидинов на экспериментальные язвы желудка различного генеза // Фармакология и токсикология. 1968. № 1. С. 69–71.
24. Барнаулов О.Д. Поиск и фармакологическое изучение фитопрепаратов, повышающих резистентность организма к повреждающим воздействиям, оптимизирующих процессы репарации и регенерации: Автореф. дисс. ... докт. Л. 1989.
25. Шаталов В.Н., Полонский В.М. Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки (Патогенез, диагностика, лечение). Москва. 1981. С. 33–39.
26. Minano F.J., Serrano J. S., Duran J.A., Sancibrian M. Protective effect of GABA and sodium valproate on stress – induced gastric lesions in guinea – pigs // *J. Pharm. Pharmacol.* 1985. V. 37. P. 675–677.
27. Keshavarzian A., Wibowo A., Gordon J.H., Fields I.Z. MPTP – induced duodenal ulcers in rat // *Gastroenterol.* 1990. V. 98. № 3. P. 554–560.
28. Pauls F., Wick A.N., Mackey E.M. An assay method for anti – ulcer substances // *Gastroenterology*. 1947. V. 8. P. 774–782.
29. Оболенцева Г.В. Фармакологическое исследование противоязвенного действия некоторых флавоноидов: Автореф. дис. ... канд. 1963.
30. Барнаулов О.Д., Савельев А.К. Сравнительная оценка влияния различных холинолитиков на образование экспериментальных деструкций слизистой оболочки желудка у белых крыс // Фармакология и токсикология. 1971. Т. 34. № 5. С. 557–560.
31. Колхир В.К., Багинская А.И., Сокольская Т.А., Лескова Т.Е., Трумпте Т.Е., Леонидова Ю.А., Воскобойникова И.В., Ферубко Е.В. Разработка гастро- и гепатопротекторных средств на основе лекарственного растительного сырья. Опыт ВИЛАР // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. № 11. С. 41–47.

Поступила 20 июля 2015 г.

EXPERIMENTAL MODELLING IN GASTROENTEROLOGY. PRACTICAL GUIDELINES. PART 1. STUDY OF GASTRIC SECRETORY FUNCTION, ASSESSMENT OF ULCERATIVE LESIONS

© Authors, 2016

A.I. Baginskaya

Ph.D. (Med.), All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR)

E.V. Ferubko

Ph.D. (Med.), Head of Department of Experimental and Clinical Pharmacology,

All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR)

E-mail: ekaterina-ferubko@rambler.ru

E.N. Kurmanova

Research Scientist, Department of Experimental and Clinical Pharmacology,

All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR)

I.V. Voskoboinikova

Ph.D. (Pharm.), Leading Research Scientist, Department of Experimental and Clinical Pharmacology,

All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR)

V.K. Kolkhir

Dr.Sc. (Med.), Chief Research Scientist, Department of Experimental and Clinical Pharmacology,

All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR)

The article presents summarized domestic (including own) and foreign experience of screening and preclinical studies of potential antiulcer (gastroprotective) biologically active substances (BAS). We suggest the most expedient approaches to search and development of BAS (both natural and synthetic) proposed for treatment of gastrointestinal disorders using models of gastric and duodenal erosive-ulcerative lesions, which reflect main factors of ulcer development. These approaches take into account the main requirements to screening and preclinical studies of therapeutic agents: quick obtaining of results, reliability of results, and minimal expenses.

Key words: *experimental models of gastric and duodenal ulcer, ulcerogenic activity, gastroprotective effect.*

References

- Krylova S.G. Rasteniya Sibiri i Dal'nego Vostoka v terapii jазvennoj bolezni zheludka i dvenadcatiperstnoj kishki (jeksperim. issled.): Avtoref. diss. ... dokt. biol. nauk. Tomsk. 2005. S. 3, 12, 23.
- Shirokova K.I. Jазvennaja bolezni // V kn.: Vasilenko V.H., Grebenev A.L. Bolezni zheludka i dvenadcatiperstnoj kishki. M.: Medicina. 1981. Gl. 6. S. 77–144.
- Minushkin O.N., Zverkov I.V., Volodin D.V., Balykina V.V., Litvin A.A. Jеffektivnost' i mesto preparata panavir v lechenii jазvennoj bolezni // Jеffektivnaja farmakoterapija v gastrojenterologii. 2009. № 2. S. 6–8.
- Grebenev A.L., Sheptulin A.A. Jазvennaja bolezni. Metodicheskie rekomendacii. Moskva. 1995. Vyp. 2. 99 s.
- Popov V.A. Membrannoe pishhevarenie pri hirurgicheskoj patologii. Leningrad. 1982. S. 92–93.
- Loginov A.S., Amirov N.Sh. O patogeneze jазvennoj bolezni (obzor) // Novoe v diagnostike i lechenii boleznej zheludka i dvenadcatiperstnoj kishki. Sbornik trudov CNIIG. Moskva. 1985. S. 5–15.
- Nord K.S. Peptic ulcer disease in pediatric population // Pediatr. Clin. N. Amer. 1988. V. 35. P. 117.
- Obolenceva G.V. Farmakologicheskoe izuchenie vlijanija nekotoryh prirodnyh i modifitsirovannyh polisaharidov na funkcii pishhevaritel'noj sistemy: Avtoref. diss. ... dokt. 1984. S. 40.
- Bul'on V.V., Hnychenko L.K., Sapronov N.S., Kuznecova N.N., Anikin V.B., Arinenko R.Ju., Kovalenko A.L., Alekseeva L.E. Cikloferan v terapii jазvy dvenadcatiperstnoj kishki u krysa // Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija. 2001. T. 64. № 6. S. 41–44.
- Indometacin // Registr lekarstv. sredstv. Jenciklopedija lekarstv / Pod red. G.L. Vyshkovskogo. 2008. S. 357.
- Semendjaeva M.E., Aleshina T.V., Akulova G.L. Venter i ego mesto sredi protivojazvennyh preparatov // Materialy simpoziuma «Primenenie preparata Venter (sukral'fat) v lechenii bol'nyh jазvennoj bolezni» / Pod red. A.S. Loginova. Moskva. 1987. S. 32–34.
- Loginov A.S., Aruin L.I., Il'chenko A.A. Jазvennaja bolezni i Helicobacter pylori. Novye aspekty patogeneticheskoj terapii. Moskva. 1993. S. 139–140.
- Vichkanova S.A., Kolkhir V.K., Sokol'skaja T.A., Voskoboinikova I.V., Bykov, V.A. Lekarstvennye sredstva iz rastenij. M: ADRIS. 2009. 432 s.
- Sernov L.N., Gacura V.V. Jеlementy jeksperimental'noj farmakologii. Moskva. 2000. S. 131–132.
- Shay H., Komarov S. A., Fels S.S., Meranze D., Gruenstein M., Siple H. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat // Gastroenterology. 1945. V. 5. P. 43–46.
- Kraevskij E.V. Sovremennyy metod issledovaniya sekretornoj funkcii zheludka // V kn.: Novye metody diagnostiki i lechenija zaboljevanij organov pishhevareniya. 1970. T. 92. S. 441–442.
- Kuvaeva I.B., Bassalyk L.S. Izuchenie dejstvija gastrina na zheludochnuju sekreciju u krysa v hronicheskom jeksperimente // Patologicheskaja fiziologija i jeksperimental'naja terapija. 1974. № 4. S. 78–81.
- Pavlov I.P. Operativnaja metodika izucheniya pishhevaritel'nyh zhelez // Fiziologija pishhevareniya. Stat'i, lekcii, doklady. Moskva. 1952. S. 344–354.
- Yamamoto O., Okada Y., Okabe S. Effects of a proton pump inhibitor, omeprazole, on gastric and duodenal ulcers, or erosions in rats // Dig. Dis. Sci. 1984. V. 29. № 5. P. 394–401.
- Laboratornye metody issledovaniya v klinike. Spravochnik / Pod red. V.V. Men'shikova. M.: Medicina. 1987. S. 85–90.
- Saton H., Inatomi N., Nagaya H., Inada I., Nohara A., Nakamura N., Maki Y. Antisecretory and antiulcer activities of a Novel Proton Pump inhibitor Ag – 1749 in dogs and rats // J. Pharmacol. and experiment. therapeutics. 1989. V. 248. № 2. P. 806–815.
- Kaminishi M., Sadatsuki H., Johjima Y., Oohara T., Kondo Y. A new model for production of chronic gastric ulcer by duodenogastric reflux in rats // Gastroenterol. 1987. V. 92. P. 1913–1918.
- Akimov A.A. O sravnitel'nom dejstvii nekotoryh pirimidinov na jeksperimental'nye jазvy zheludka razlichnogo geneza // Farmakologija i toksikologija. 1968. № 1. S. 69–71.
- Barnaulov O.D. Poisk i farmakologicheskoe izuchenie fitopreparatov, povyshajushih rezistentnost' organizma k povrezhdajushhim vozdeystvijam, optimizirujushih processy reparacii i regeneracii: Aftorf. diss. ... dokt. L. 1989.
- Shatalov V.N., Polonskij V.M. Jазvennaja bolezni dvenadcatiperstnoj kishki (Patogeneza, diagnostika, lechenie). Moskva. 1981. S. 33–39.
- Minano F.J., Serrano J. S., Duran J.A., Sancibrian M. Protective effect of GABA and sodium valproate on stress – induced gastric lesions in guinea – pigs // J. Pharm. Pharmacol. 1985. V. 37. P. 675–677.
- Keshavarzian A., Wibowo A., Gordon J.H., Fields I.Z. MPTP – induced duodenal ulcers in rat // Gastroenterol. 1990. V. 98. № 3. P. 554–560.
- Pauls F., Wick A.N., Mackey E.M. An assay method for anti –ulcer substances // Gastroenterology. 1947. V. 8. P. 774–782.
- Obolenceva G.V. Farmakologicheskoe issledovanie protivojazvennogo dejstvija nekotoryh flavonoidov: Aftoref. dis. ... kand. 1963.
- Barnaulov O.D., Savel'ev A.K. Sravnitel'naja ocenka vlijaniya razlichnyh holinolitikov na obrazovanie jeksperimental'nyh destrukcij slizistoj obolochki zheludka u belyh krysa // Farmakologija i toksikologija. 1971. T. 34. № 5. S. 557–560.
- Kolkhir V.K., Baginskaja A.I., Sokol'skaja T.A., Leskova T.E., Trumpe T.E., Leonidova Ju.A., Voskoboinikova I.V., Ferubko E.V. Razrabotka gastro- i gepatoprotekturnykh sredstv na osnove lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ja. Opyt VILAR // Voprosy biologicheskoj, medicinskoj i farmaceuticheskoj himii. 2013. № 11. S. 41–47.

УДК 2.616.36-089.843
© Коллектив авторов, 2016

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ СПОСОБ КОНСЕРВАЦИИ ПЕЧЕНОЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА

А.С. Сохареv

врач-хирург, Кузбасский областной гепатологический центр МБУЗ «ГКБ № 3 им. М.А. Подгорбунского» (г. Кемерово)
E-mail: sokharevas@mail.ru

К.А. Краснов

к.м.н., доцент, кафедра госпитальной хирургии, Кемеровская государственная медицинская академия;
директор Кузбасского областного гепатологического центра МБУЗ «ГКБ № 3 им. М.А. Подгорбунского» (г. Кемерово)

А.В. Будаев

д.м.н., профессор, кафедра патологической физиологии, Кемеровская государственная медицинская академия

Е.Ю. Плотникова

д.м.н., профессор, кафедра подготовки врачей первичного звена здравоохранения,
руководитель курса клинической гастроэнтерологии, Кемеровская государственная медицинская академия

Представлен оригинальный способ применения комбинированного способа консервации печени для трансплантации. Показано, что применение комбинированного консерванта позволяет профилактировать ишемически-реперфузионное повреждение в печеночном трансплантате.

Ключевые слова: трансплантация печени, неоксигенированная перфторорганическая эмульсия.

Трансплантация печени в настоящее время является «золотым стандартом» при лечении терминальных стадий заболеваний печени независимо от этиологии. Количество «удачных» трансплантаций печени связано не с числом потенциальных доноров, а с качеством трансплантата, его функциональностью. Существуют причины, по которым даже безупречно проведенная пересадка печени приводит к гибели пациента ввиду первичного нефункционирования трансплантата.

Ишемически-реперфузионное повреждение (ИРП) трансплантата является основным фактором повреждения тканей при трансплантации, и, следовательно, основной причиной первично нефункционирующего трансплантата [1, 5, 13, 14]. Оксидативный стресс, обусловленный дисбалансом производства и инактивацией активных форм кислорода (АФК), играет важную роль в ИРП из-за окислительной деструкции липидов, белков и нуклеиновых кислот в пораженной ткани [2, 9].

Медикаментозная терапия является перспективной методикой для профилактики ИРП при трансплантации органов. Однако прежде чем проводить медикаментозную интервенцию должно быть принято во внимание то, что механизм образования свободных радикалов очень сложен и требует углубленного понимания патогенеза ИРП. Свободные радикалы обладают чрезвычайно ко-

ротким периодом полураспада. Сроки вмешательства имеют решающее значение. Некоторые медикаментозные препараты могут оказывать проокислительные эффекты при определенных обстоятельствах [4, 6, 7].

Различия между дозой медикаментозного препарата, временем и способом введения могут привести к непредвиденным результатам. Оценка медикаментозного воздействия препаратов требует лабораторных испытаний, в которых эффекты от лечения могут быть тщательно изучены, а только затем рекомендованы для клинического применения [1, 8, 10]. Учитывая то обстоятельство, что проблема противоишемической защиты трансплантата печени далека от своего окончательного решения, представляется достаточно актуальной разработка современных методов воздействия, позволяющих эффективно бороться с этими расстройствами [3, 6, 13].

Цель исследования – изучение и оценка применения комбинированного способа консервации для профилактики ИРП при трансплантации печени у лабораторных животных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на 60 кроликах-самцах породы шиншилла в возрасте 6–7 мес., массой 2000±150 г. Кролики были разделены на три груп-

пы по 20 животных. В первой группе консервацию печени проводили раствором «Кустодиол» (НТК – гистидин-триптофан-кетоглутарат). Во второй группе применяли комбинированный способ: раствор НТК и неоксигенированная перфторорганическая эмульсия (соотношение НТК и эмульсии – 4:1 соответственно). В третьей группе консервацию печени проводили в неоксигенированной перфторорганической эмульсии.

Консервацию печени осуществляли бесперфузионным методом в течение 8 ч, при температуре 4–5 °С. С целью изучения биохимических показателей, системы гемостаза и общего анализа крови при эксплантации и после реперфузии брали кровь. Данные обрабатывали в программе Statistica 6.0, для описательных статистик были рассчитаны средние значения, стандартное отклонение, ошибка среднего. Для выявления различий в средних значениях признаков использовали критерий

Манна–Уитни. Проценты сравнивали с помощью углового преобразования Фишера. Чтобы установить взаимосвязи, строили таблицы сопряженности и применяли критерий Пирсона. Различия считали значимыми при уровне значимости $p < 0,05$ [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

До консервации трансплантатов печени кроликов и после 8-часовой консервации трансплантатов печени были рассчитаны в группах средние значения, стандартное отклонение, стандартная ошибка. С помощью критерия Манна–Уитни сравнивались средние значения показателей во второй и третьей группах трансплантатов печени кроликов до консервации. Результаты сравнения показателей до консервации представлены в табл. 1.

Результаты сравнения показателей в группах трансплантатов печени кроликов после 8-часовой консервации показаны в табл. 2.

Таблица 1. Результаты сравнения средних значений показателей в исследуемых группах до консервации трансплантатов печени кроликов

Показатель	Группа			Уровень значимости различий (p)		
	1-я	2-я	3-я	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
Билирубин общий, мкмоль/л	3,31	3,21	2,73	0,989209	0,239323	0,159544
АсАТ, Ед/л	52,09	51,84	55,48	0,797197	0,481827	0,180577
АлАТ, Ед/л	59,60	58,48	58,62	0,675014	0,635866	0,818150
ПТИ, %	88,25	91,25	87,90	0,417078	0,978362	0,473481
АЧТВ, с	36,25	35,60	36,40	0,279252	0,913317	0,350703
Фибриноген, г/л	2,95	3,00	2,99	0,786775	0,755086	0,755743

Таблица 2. Результаты сравнения средних значений показателей в исследуемых группах после 8-часовой консервации трансплантатов печени кроликов

Показатель	Группа			Уровень значимости различий (p)		
	1-я	2-я	3-я	p_{1-2}	p_{1-3}	p_{2-3}
Билирубин общий, мкмоль/л	5,81	5,44	6,31	0,002086	0,002100	0,000000
АсАТ, Ед/л	606,73	322,82	1040,15	0,000000	0,000000	0,000000
АлАТ, Ед/л	614,17	277,60	978,10	0,000000	0,000000	0,000000
ПТИ, %	62,80	74,70	39,60	0,000000	0,000000	0,000000
АЧТВ, с	53,60	45,35	56,55	0,000000	0,045296	0,000000
Фибриноген, г/л	1,66	2,32	1,39	0,000000	0,000245	0,000000

Примечание: АсАТ – аспаратаминотрансфераза, АлАТ – аланинаминотрансфераза, ПТИ – протромбиновый индекс, АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время.

С помощью дисперсионного анализа с повторными измерениями сравнивались средние значения показателей в разных группах и разных замерах. Результаты дисперсионного анализа при оценке среднего значения общего билирубина представлены на рис. 1, на котором видно, что произошли статистически значимые изменения в среднем значении показателей в различных группах до и после консервации трансплантатов печени кроликов ($p = 0,00001$). Причем, если до консервации трансплантата в третьей группе наблюдался самый низкий уровень билирубина, то после 8-часовой консервации трансплантатов печени кроликов наиболее низкий уровень наблюдался во второй группе, в то время как самый высокий уровень билирубина – у трансплантатов печени кроликов третьей группы.

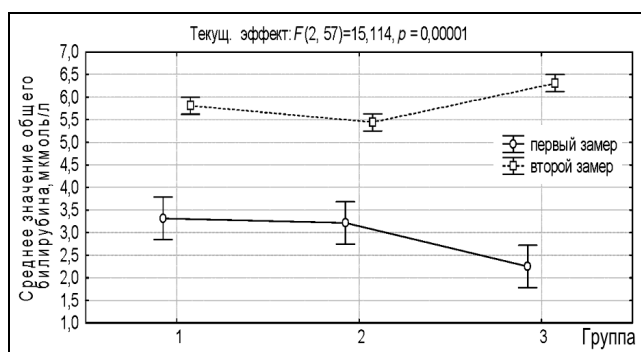


Рис. 1. Графики средних значений общего билирубина в трех группах до (первый замер) и после 8-часовой (второй замер) консервации

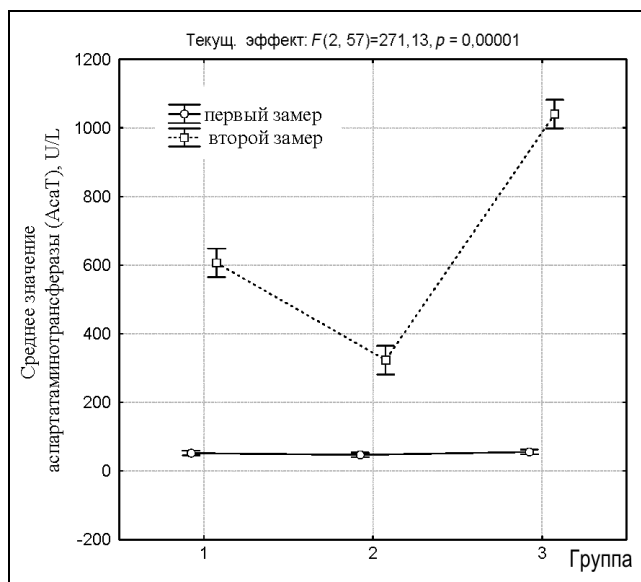


Рис. 2. Графики средних значений аспаратаминотрансферазы (АсАТ) в трех группах до (первый замер) и после 8-часовой (второй замер) консервации

Результаты дисперсионного анализа при оценке среднего значения аспаратаминотрансферазы (АсАТ) до и после 8-часовой консервации представлены на рис. 2. Показано, что на исследуемый показатель влияет взаимосвязь факторов ($p = 0,00001$): имеются статистически значимые различия в средних значениях показателя до и после 8-часовой консервации трансплантатов печени кроликов в зависимости от группы. Так, если до консервации средние значения АсАТ в трех группах различались незначимо, то после консервации имели место статистически значимые различия: наиболее низкий уровень АсАТ наблюдался во второй группе, в то время как в первой и третьей группах уровень АсАТ был статистически значимо выше.

В результате анализа выявлены статистически значимые изменения в средних значениях показателя, произошедшие до и после 8-часовой консервации в разных группах ($p = 0,00001$). Если до консервации трансплантатов печени кроликов средние значения аланинаминотрансферазы (АлАТ) в трех группах различались незначимо, то после 8-часовой консервации трансплантатов наиболее низкий уровень наблюдался во второй группе, а самый высокий – в третьей группе.

Было изучено применение неоксигенированной эмульсии перфторорганических соединений для профилактики ИРП при трансплантации печени у лабораторных животных. Исследования, проведенные на лабораторных животных, показали, что по всем показателям статистически значимых различий в средних значениях показателей в сравниваемых группах до консервации не выявлено. После консервации трансплантатов печени кроликов отмечаются статистически значимые различия в группах в зависимости от консервирующего раствора.

При сравнении с помощью критерия Манна–Уитни во второй группе (с комбинированным консервантом) после 8-часовой консервации трансплантатов печени кроликов по сравнению с первой и третьей группами выявлен статистически значимо ниже уровень общего билирубина ($p_{1-2} = 0,002086$, $p_{2-3} = 0,000000$), а наиболее высокий уровень билирубина отмечался в третьей группе. Аналогичная ситуация наблюдалась с уровнем свободного и связанного билирубина.

При сравнении с помощью критерия Манна–Уитни во второй группе (комбинированный

консервант) после 8-часовой консервации трансплантатов печени кроликов по сравнению с первой и третьей группами выявлен статистически значимо ниже уровень АсАТ и АлАТ – синдром цитолиза: (АсАТ $p_{1-2} = 0,000000$, $p_{2-3} = 0,000000$; АлАТ $p_{1-2} = 0,000000$, $p_{2-3} = 0,000000$), а наиболее высокий уровень АсАТ и АлАТ отмечался в третьей группе.

При сравнении с помощью критерия Манна–Уитни во второй группе после 8-часовой консервации трансплантатов печени кролика по сравнению с первой и третьей группами выявлен статистически значимо выше уровень гемостаза (фибриноген, ПТИ, АЧТВ), т. е. показатели наиболее приближены к норме: (фибриноген $p_{1-2} = 0,000006$, $p_{2-3} = 0,000000$; ПТИ $p_{1-2} = 0,000000$, $p_{2-3} = 0,000000$, АЧТВ $p_{1-2} = 0,000000$, $p_{2-3} = 0,000000$), а проявления наиболее тяжелой гипокоагуляции отмечались в третьей группе.

По результатам исследования применение перфторорганической эмульсии как самостоятельного консерванта невозможно, так как она:

не предотвращает отек клетки (осмолярность – 280–310 мОсм/л; рН – 7,2–7,8);

не влияет на калий-натриевый насос, ввиду концентраций ионов натрия и калия, приближенных к плазме крови;

не поддерживает гомеостаз и рН клетки из-за отсутствия в составе буферной системы.

Перфторорганическая эмульсия не влияет на внутриклеточный метаболизм и тем самым не поддерживает внутриклеточный гомеостаз во время холодовой ишемии. Применение перфторорганической эмульсии заключается в акцепции активных форм кислорода и отсутствии влияния на клеточный метаболизм в условиях ишемии [11].

Применение раствора НТК позволяет в условиях гипотермии инактивировать функции клеток органа путем удаления внеклеточного натрия и кальция, а также интенсивной буферизации внеклеточного пространства с помощью гистидина, чтобы продлить период холодовой ишемии. Состав раствора НТК аналогичен внеклеточной жидкости с высокой буферной системой и пониженной по сравнению с плазмой концентрацией ионов натрия и калия, что позволяет предотвратить клеточный отек и задержать клеточную деструкцию и служит буфером для поддержания надлежащего гомеостаза. В то же время консервация органа в растворе НТК лимитирована во времени из-за об-

разования активных форм кислорода и повреждения клеточной стенки [3, 8, 10].

Основным преимуществом неоксигенированной перфторуглеродной эмульсии является ее интактность к тканям и органам, т.е. препарат не метаболизируется в клетках (гепатоцитах) в отличие от других антигипоксантов. Уникальная тропность перфторорганической эмульсии к кислороду послужила основанием для применения комбинированного консерванта с целью акцепции и нейтрализации АФК, а следовательно, снижения свободно-радикального окисления и ИРП в органах и тканях [11, 12].

Применение комбинированного консерванта позволяет профилактировать ИРП в печеночном трансплантате путем поглощения АФК молекулами перфторорганической эмульсии, тем самым предотвращая повреждение органов и тканей. В исследовании показано, что комбинированный консервант статистически значимо уменьшает ИРП печеночного трансплантата со значительным снижением уровня АлАТ и АсАТ по сравнению с группами, в которых применялся обычный консервант. Таким образом, в группе с комбинированным консервантом отмечается статистически значимое снижение ИРП после 8-часовой консервации печеночного трансплантата кролика.

ВЫВОДЫ

1. Современное представление о ИРП печеночного трансплантата остается краеугольным камнем в клинической практике. Тем не менее терапевтический подход, такой как фармакологическая интервенция, может способствовать предотвращению или ограничению ИРП.
2. Применение комбинированного консерванта, новой терапевтической концепции для профилактики ИРП печеночного трансплантата позволяет получить трансплантат лучшего качества за счет инактивации АФК и уменьшения перекисного окисления липидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zhai Y., Petrowsky H., Busuttill R.W., et al. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation – from bench to bedside // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2013. № 2. P. 79–89.
2. Adam A.N.I. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury // International journal of general medicine. 2014. № 7. P. 483–489.

3. *Zhai Y., Busuttill R.W., Kupiec-Weglinski J.W.* Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation // *Am. J. Transplant.* 2011. № 11. P. 1563–1569.
4. *Caldwell C.C., Tschoep J., Lentsch A.B.* Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury // *J. Leukoc. Biol.* 2007. № 82. P. 457–464.
5. *Abu-Amara M., Yang S.Y., Tapuria N., et al.* Liver ischemia/reperfusion injury: Processes in inflammatory networks – a review // *Liver. Transpl.* 2010. № 16. P. 1016–1032.
6. *Weiss S., Kotsch K., Francuski M.* Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation // *Am. J. Transplant.* 2007. № 7. P. 1584–1593.
7. *Shen X.D., Gao F., Ke B., et al.* Inflammatory responses in a new mouse model of prolonged hepatic cold ischemia followed by arterialized orthotopic liver transplantation // *Liver Transpl.* 2005. № 11. P. 1273–1281.
8. *Jia J.J., Li J.H., Jiang L., et al.* Liver protection strategies in liver transplantation // *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2015. V. 14. № 1. P. 34–42.
9. *Quesnelle K.M., Bystrom P.V., Toledo Pereyra L.H.* Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver // *Arch. Toxicol.* 2015. № 2. P. 103–109.
10. *Golen R.F., Reiniers M.J., Heger M., et al.* Solutions to the discrepancies in the extent of liver damage following ischemia/reperfusion in standard mouse models // *Journal of Hepatology.* 2015. № 14. P. 88–90.
11. *Багненко С.Ф., Шлык И.В., Батоцыренов Б.В. и соавт.* Фармакоэкономическая оценка применения лекарственного средства перфторан в клинической практике // *Вестник службы крови России.* 2005. № 2. P. 46–51.
12. *Сухоруков В.П., Рагимов А.А., Пушкин С.Ю. и соавт.* Перфторан – перфторуглеродный кровезаменитель с газотранспортной функцией: пособие для врачей. 2-е изд-е, перераб. и доп. М. 2008. 79 с.
13. *Цой Д.Л., Мойсюк Я.Г.* Профилактика и лечение ишемически-реперфузионных повреждений при трансплантации печени – возможный путь к расширению донорского пула // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2013. Т. 3. № 15. P. 102–114.
14. *Готье С.В., Мойсюк Я.Г., Хомяков С.М.* Донорство и трансплантация органов в Российской Федерации в 2014 году (VII регистра Российского трансплантологического общества) // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2015. Т. 2. № 17. P. 7–22.
15. *Трухачева Н.В.* Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2013. 384 с.

Поступила 12 января 2016 г.

THE EXPERIMENTAL METHOD OF PRESERVING LIVER TRANSPLANT

© Authors, 2016

A.S. Soharev

MD, surgeon of the Kuzbass Hepatology Center, Hospital № 3 behalf Podgorbunsky (Kemerovo)

E-mail: sokharevas@mail.ru

K.A. Krasnov

Ph.D. (Med.), Director of the Kuzbass Hepatology Center, Hospital № 3 behalf Podgorbunsky (Kemerovo)

A.V. Budaev

Dr.Sc. (Med.), Professor, Department Pathological Physiology, Kemerovo State Medical Academy

E.Y. Plotnikova

Dr.Sc. (Med.), Professor, Department of Education Primary Care Doctors, Course Director of Clinical Gastroenterology, Kemerovo State Medical Academy

Liver transplantation is a standard treatment for patients with end-stage liver disease and unresectable liver tumors. The number of patients waiting for a liver transplant is increasing. This situation led to the adoption of extended criteria donor liver. The use of transplants from "marginal" donors has led to increased biliary strictures, acute and hyperacute rejection of organs and primary non-functioning graft, and thus the growth of retransplantation. Ischemic reperfusion injury is a major cause of graft initially nonfunctioning graft. Drug therapy is a promising technique for the prevention of disturbance in organ transplantation. This article studied and evaluated the use of the combined method for the prevention of disturbance in liver transplantation in laboratory animals. Studies carried out on rabbits divided into 3 groups of 20 animals. In the first group performed a liver preservation solution Custodiol. In the second group used a combined method: Custodiol and not oxygenated emulsion perfluororganic compounds in a ratio of 4:1. In the third group of liver preservation carried not oxygenated emulsion perfluororganic compounds. Preserved liver carried without perfusion method for 8 hours at a temperature of 4-5 °C. When comparing the second group after the graft preservation rabbit liver as compared with the first and third groups are statistically significantly lower cytolysis syndrome and anticoagulation. The most severe manifestations of the syndrome of cytolysis and heavy hypocoagulation observed in the third group. The use of the new combined method of preserving liver transplant can reduce ischemia-reperfusion injury of the liver, reduce the risk of primary nonfunctioning graft prevention hepatocellular failure in post-transplant period.

Key words: liver transplantation, not oxygenated perfluororganic emulsion.

References

1. *Zhai Y., Petrowsky H., Busuttill R.W., et al.* Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation – from bench to bedside // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013. V. 2. P. 79–89.

- Adam A.N.I. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury // International journal of general medicine. 2014. № 7. P. 483–489.
- Zhai Y., Busuttill R.W., Kupiec-Weglinski J.W. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation // Am J Transplant. 2011. № 11. P. 1563–1569.
- Caldwell C.C., Tschoep J., Lentsch A.B. Lymphocyte function during hepatic ischemia/reperfusion injury // J Leukoc Biol. 2007. № 82. P. 457–464.
- Abu-Amara M., Yang S.Y., Tapuria N., et al. Liver ischemia/reperfusion injury: Processes in inflammatory networks – a review. // Liver Transpl. 2010. № 16. P. 1016–1032.
- Weiss S., Kotsch K., Francuski M. Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. // Am J Transplant. 2007. № 7. P. 1584–1593.
- Shen X.D., Gao F., Ke B., et al. Inflammatory responses in a new mouse model of prolonged hepatic cold ischemia followed by arterialized orthotopic liver transplantation // Liver Transpl. 2005. № 11. P. 1273–1281.
- Jia J.J., Li J.H., Jiang L., et al. Liver protection strategies in liver transplantation // Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2015. V. 14. № 1. P. 34–42.
- Quesnelle K.M., Bystrom P.V., Toledo Pereyra L.H. Molecular responses to ischemia and reperfusion in the liver // Arch Toxicol. 2015. № 2. P. 103–109.
- Golen R.F., Reiniers M.J., Heger M., et al. Solutions to the discrepancies in the extent of liver damage following ischemia/reperfusion in standard mouse models // Journal of Hepatology. 2015. № 14. P. 88–90.
- Bagnenko S.F., Shlyk I.V., Batocytrenov B.V. i soavt. Farmakoeconomicheskaja ocenka primenenija lekarstvennogo sredstva perfortoran v klinicheskoj praktike // Vestnik sluzhby krovi Rossii. 2005. № 2. R. 46–51.
- Suhorukov V.P., Ragimov A.A., Pushkin S.Ju. i soavt. Perfortoran – perfortoruglerodnyj krovezamenitel' s gazotransportnoj funkciej: posobie dlja vrachej. 2-e izd-e, pererab. i dop. M. 2008. 79 s.
- Coj D.L., Mojsjuk Ja.G. Profilaktika i lechenie ishchemicheski-reperfuzyonnyh povrezhdenij pri transplantacii pecheni – vozmozhnyj put' k rasshireniju donorskogo pula // Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov. 2013. V. 3. № 15. R. 102–114.
- Got'e S.V., Mojsjuk Ja.G., Homjakov S.M. Donorstvo i transplantacija organov v Rossijskoj Federacii v 2014 godu (VII registra Rossijskogo transplantologicheskogo obshhestva) // Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov. 2015. V. 2. № 17. R. 7–22.
- Truhacheva N.V. Matematicheskaja statistika v mediko-biologicheskikh issledovanijah s primeneniem paketa Statistica. M.: GJeOTAR-Media. 2013. 384 s.

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ !

Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений приглашает принять участие в Международной научно-практической конференции
«Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине»
(к 85-летию ФГБНУ ВИЛАР и 65-летию Ботанического сада).
Конференция очная, дата проведения – **23-25 июня 2016 г.**

Направления конференции:

- Мобилизация биоразнообразия флоры РФ с целью создания лекарственных средств: ресурсы, сырьевая база, методы обследования и анализа, экология видов лекарственных растений, сохранение генофонда, интродукция.
- Лекарственное растениеводство: современные аспекты развития (возделывание, селекция, семеноводство, защита растений, культура клеток, микрклональное размножение, цитогенетические исследования).
- Метаболом биообъектов: системное изучение с целью формирования подходов по оценке качества и безопасности, фитометаболомика.
- Вторичные метаболиты фитообъектов: особенности формирования как целевых продуктов.
- Фитохимическое изучение и стандартизация лекарственных растений и субстанций: инновационные подходы к созданию современных лекарственных форм.
- Доклинические и клинические исследования фитопрепаратов: актуальные проблемы создания новых эффективных и безопасных лекарственных средств.

Приём материалов (тексты статей) – не позднее **20 апреля 2016 г.**

Время доклада 20 мин, сообщения – 10 мин.

Обращаться в оргкомитет конференции по тел.:

8(495)388-59-27, Зайко Леонид Николаевич – e-mail: vilarnii@mail.ru;

8(495)388-48-55, Масляков Валерий Юрьевич – e-mail: maslyakoff@mail.ru;

8(926) 430-33-30, Бушуева Гульнара Раисовна – e-mail: gulnara.khab@mail.ru

БИФИДОГЕННЫЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДОВ ЛАКТОФЕРРИНА ИЗ КОРОВЬЕГО МОЛОКА

Л.С. Самохина

к.б.н., мл. науч. сотрудник, Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН (Москва)
E-mail: 6423918@mail.ru

В.И. Ганина

д.т.н., профессор, Московский государственный университет технологий и управления имени К.Г. Разумовского (Первый казачий университет)
E-mail: vigan5428@yandex.ru

И.И. Ионова

к.т.н., доцент, Московский государственный университет пищевых производств (МГУПП)
E-mail: inna-ionova@yandex.ru

Г.С. Комолова

д.б.н., профессор, вед. науч. сотрудник, Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН (Москва)
E-mail: KomolovaGS@yandex.ru

М.А. Головин

аспирант, Московский государственный университет пищевых производств (МГУПП)
E-mail: golovin787@ya.ru

Изучено влияние низкомолекулярного пептидного комплекса, полученного протеолизом пепсином лактоферрина из коровьего молока, на производственно-значимые штаммы бифидобактерий: *Bifidobacterium bifidum* и *Bifidobacterium adolescentis*. Установлено, что влияние пептидного комплекса на рост бифидобактерий оказалось эффективнее, чем у нативного лактоферрина. Активированный по ростовому показателю штамм *Bifidobacterium adolescentis* одновременно демонстрировал способность проявлять антимикробный эффект в отношении патогенных эшерихий.

Ключевые слова: лактоферрин коровьего молока, низкомолекулярный пептидный комплекс лактоферрина, производственно-значимые штаммы бифидобактерий, антимикробный эффект.

Сывороточный белок коровьего молока – лактоферрин (ЛФ) известен как полифункциональный защитный фактор [1, 2]. Он обладает антимикробной, антиоксидантной, противовоспалительной, противораковой активностью. Значима роль лактоферринов молока млекопитающих в поддержании нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Это достигается путём ингибирования патогенных микробов при одновременном положительном влиянии на полезную микрофлору. Внесение ЛФ в рецептуры продуктов, предназначенных для детского питания, способствует поддержанию нормобиоценоза кишечника. Такие продукты особенно востребованы для ослабленных детей с нарушениями пищеварения, грудных младенцев, находящихся на искусственном вскармливании [3]. В ЖКТ белки, подвергаясь расщеплению протеолитическими ферментами, образуют пептиды, кото-

рые по физиологическим свойствам могут значительно отличаться от исходных полипептидов.

В последние годы отмечается большой интерес к изучению защитных свойств пептидов ЛФ, которые по целому ряду биологических показателей оказались более активными, чем исходные нативные белки [4–6].

Ранее нами из ферментативного гидролизата лактоферрина молока был выделен пептидный комплекс, обозначенный как IVЛФ. В экспериментах на животных было показано, что он более эффективно, чем ЛФ, предотвращает образование химически индуцируемой язвы в желудке [7] и развитие дисбактериоза в кишечнике при приеме антибиотиков [8].

Можно предположить, что более высокое защитное действие на ЖКТ комплекса IVЛФ, по сравнению с ЛФ, осуществляется в значительной мере на уровне патогенной и полезной микрофлоры кишечника. Действительно, в работе [9] было показано,

что IVЛФ проявляет более сильное, чем ЛФ, бактериостатическое действие на *Escherichia coli* O157:H7 – представителя патогенной микрофлоры, возбудителя энтерогеморрагической коли-инфекции.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – сравнительное изучение влияния ЛФ и IVЛФ на изолированные штаммы пробиотических микроорганизмов – бифидобактерии, а именно на их пролиферативную и антагонистическую активность против патогена.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Лактоферрин был выделен из коровьего молока катионообменной хроматографией [10]. Протеолиз предварительно переведенного в апоформу лактоферрина проводили свиным пепсином с активностью 38 U/мг («Sigma-Aldrich», США) при 37 °С, рН=2. Концентрация фермента составляла 3% (w/w субстрата). Реакцию останавливали нагреванием в течение 15 мин при 80 °С. После нейтрализации 1 н NaOH смесь центрифугировали при 15000 g. Принятые в работе условия ферментализации ЛФ соответствуют установленным ранее для получения активной антибактериальной пептидной фракции, обозначенной как IVЛФ [2]. Полученный ферментализат был проанализирован с использованием электрофореза в SDS-ПААГ и высокоэффективной обращёно-фазовой хроматографии с масс-спектрометрией.

В качестве мишени бифидогенного действия пептидного комплекса исследовали используемые в молочной промышленности штаммы пробиотических микроорганизмов – бифидобактерий: *Bifidobacterium bifidum* (штамм 1 – препарат бифидумбактерин и три новых штамма №№ 668, 676, 678 из коллекции микроорганизмов МГУПП), *Bifidobacterium adolescentis* В-1 (ВКПМ АС-1243 из коллекции микроорганизмов МГУПП).

Бактерии выращивали в анаэробных условиях в питательном бульоне MRS с цистеином. О росте культуры судили по изменению оптической плотности бактериальной суспензии при длине волны 670 нм и количеству жизнеспособных клеток (КОЕ) в бактериальной суспензии, которое определяли подсчетом колоний, выросших в анаэробных условиях на чашках Петри, на твёрдом MRS-агаре. На основании полученных данных были построены калибровочные кривые, которые использовали в дальнейших исследованиях.

Антагонистическую активность бифидобактерий устанавливали относительно тест-культуры патогенных кишечных палочек *Escherichia coli* O157:H7, используя метод агародиффузии с лунками. Метод основан на способности метаболитов микроорганизмов диффундировать в агар, зараженный тест-микробом, формируя вокруг лунки ($d = 6$ мм), заполненной опытным образцом, зоны ингибирования поверхностного роста тест-культуры. Расплавленный питательный MRS-агар, смешанный с *E. coli* O157:H7, разливали по чашкам Петри. Применение среды MRS обусловлено тем, что на ней могут развиваться и *E. coli* и *B. bifidum*. В застывшей среде специальным металлическим цилиндром вырезали лунки диаметром 6 мм, в которые вносили надосадочную культуральную жидкость, полученную путём центрифугирования свежеприготовленной культуры бифидобактерий, выращенной в бульоне MRS, после нейтрализации кислотности. Через 16 ч культивирования посевов при 37 °С измеряли (циркулем-штангельциркулем) размер прозрачной зоны вокруг лунок (зону торможения роста патогенных бактерий), которая может образоваться за счет продуцируемых пробиотиками антимикробных веществ. Количество клеток тест-культуры, вносимой в питательную среду, составляло 10^6 КОЕ в 1 см^3 ; количество клеток культуры бифидобактерий, вносимых в лунку также составляло 10^6 КОЕ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электрофоретические и хроматоспектрометрические исследования показали, что полученный в результате протеолиза гидролизат состоит из семи пептидов с молекулярной массой ниже 3000 Да (таблица).

С учетом этих данных, а также анализа на ингибирующую активность относительно штамма кишечной палочки ($\text{MIC}_{100} \approx 2\text{ мкг/ см}^3$) пептидный комплекс может быть идентифицирован как IVЛФ.

Известно, что бифидобактерии играют важную роль в поддержании иммунитета человека и прежде всего это касается состояния полезной микрофлоры ЖКТ. Повышение уровней её защитных популяций приводит к подавлению роста условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, препятствует развитию дисбактериозов. Сравнительное исследование влияния ЛФ и IVЛФ на различные штаммы бифидобактерий показало, что боль-

Таблица. Некоторые характеристики пептидов гидролизата IVЛФ

№ пептида	Молекулярная масса, Да	Число аминокислотных остатков	Аминокислотная последовательность
1	2005	83	[573–590]
2	1887	70	[172–188]
3	1604	58	[36–47]
4	1547	28	[63–77]
5	1258	63	[139–150]
6	1084	53	[129–138]
7	1075	78	[671–679]

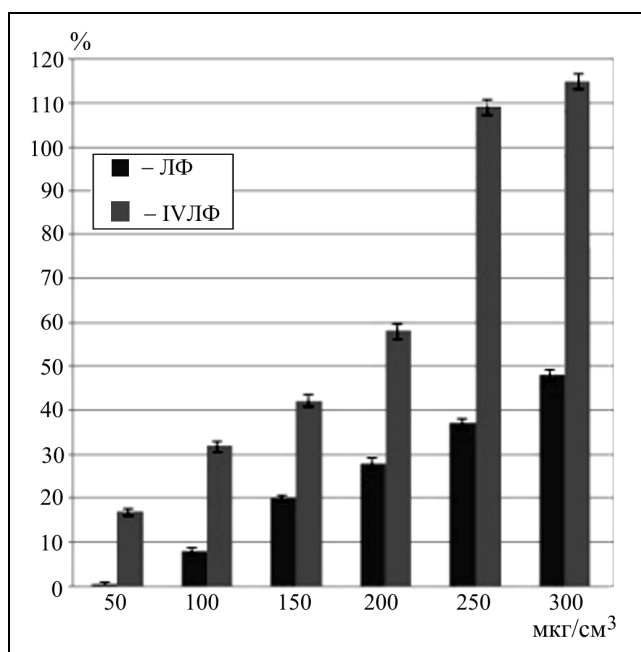


Рис. 1. Активация роста *B. adolescentis* B-1 нативным ЛФ и пептидным комплексом IVЛФ (ось абсцисс – концентрация в культуральной среде; ось ординат – количество клеток бифидобактерий, КОЕ в 1 см³ культуральной среды, по сравнению с контролем без добавления пептидов, принятым за 0%)

шинство из них способны повышать рост под влиянием этих агентов, причем более значительный эффект был установлен для пептидного комплекса, но при этом он носил штаммовзависимый характер. Так, из исследуемых бактерий в пределах доз 50–1000 мкг/см³ оба агента совсем не оказывали влияние на рост *B. bifidum* 678, а положительный дозозависимый эффект, причем более выраженный для

IVЛФ, был установлен относительно: *B. bifidum* 1, *B. bifidum* 668, *B. bifidum* 676, *B. adolescentis* B-1. Так, максимальное стимулирующее рост действие для штамма *B. bifidum* 1 наблюдалось при концентрации ЛФ примерно 1000 мкг/см³, для IVЛФ – в 10 раз ниже.

Наиболее выраженный стимулирующий эффект среди изучаемых штаммов был отмечен относительно *B. adolescentis* B-1. Как следует из результатов, представленных на рис. 1, пептидный комплекс лактоферрина активировал рост штамма бифидобактерий в десять и более раз, тогда как нативный лактоферрин не оказывает такого действия.

При этом влияние пептидного комплекса растет пропорционально дозе до значений, при которых дальнейшее ее повышение уже становится неэффективным. Это может быть обусловлено насыщением агентом специфически связывающих его рецепторов, ответственных за клеточный рост. Более высокая активация бифидобактерий пептидами, вероятно, связана с тем, что высвобождаясь из нативного белка, несущие соответствующую функциональную нагрузку низкомолекулярные катионные пептиды легче проникают через поверхностные клеточные структуры, связываясь с мембранными рецепторами, и лучше усваиваются. На взаимодействие пептида с клетками бактерий также могут влиять такие его характеристики, как длина аминокислотной цепочки и состав, включая аминокислотную последовательность [5].

Активацию клеточной пролиферации через механизмы, связанные с утилизацией бифидобак-

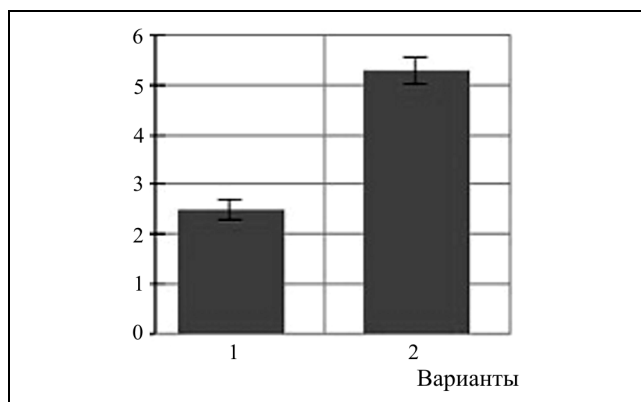


Рис. 2. Влияние нативного ЛФ и пептидного комплекса IVЛФ на продуцирование *B. adolescentis* B-1 антимикробных факторов: 1 – в культуральную среду внесён ЛФ до конечной концентрации 200 мкг/см³; 2 – в культуральную среду внесён IVЛФ до конечной концентрации 200 мкг/см³ (ось ординат – прирост зоны торможения роста)

териями трехвалентного железа ЛФ следует исключить, так как в работе был использован ненасыщенный железом белок (в апо-форме).

Известно, что антибиотические свойства бифидобактерий могут быть связаны с выработкой бактериоцинов, обладающих бактериостатическим действием на *E. coli*, *Staph. aureus*, *Shigella Sonne*, *Shigella flexneri*, *Salmonella*. Согласно результатам анализа методом агародиффузии с лунками, обладающий высокой ростовой реакцией на IVЛФ штамм *Bifidobacterium adolescentis* B-1, возможно, вырабатывает в качестве антимикробных факторов бактериоцины, поскольку антимикробное действие наблюдалось после нейтрализации кислотности в суспензии. Вокруг лунок на агаре образовывались отчётливые зоны торможения роста *Escherichia coli* O157:H7.

Если в суспензию вносили ЛФ и IVЛФ, зона торможения увеличивалась, причем эффект был более выражен для пептидного комплекса (рис. 2).

Следует отметить, что повышение под влиянием изучаемых агентов показателей роста культуры и выработки антимикробных факторов в процентном выражении практически совпадает. Следовательно, при активации роста бифидобактерий функциональная способность клеток продуцировать антимикробные факторы полностью сохраняется.

ВЫВОДЫ

Полученные в работе данные свидетельствуют, что IVЛФ может рассматриваться как потенциальный более биологически активный, чем ЛФ, компонент композиций с промышленными штаммами бифидобактерий. Их скрининг на реактивность к IVЛФ по бифидогенности может осуществляться путем анализа на ростовой эффект.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pierce A, Legrand D, Mazurier J. Lactoferrin: a multifunctional protein // Med. Sci. (Paris). V. 25. № 4. P. 361–369.
2. Tomita M., Wakabayashi H., Shin K., Yamauchi K., Yaeshima T., Iwatsuki K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications // Biochimie. 2009. V.91. № 1. P. 52–57.
3. Zavaleta N., Figueroa D., Rivera J., Sánchez J., Alfaro S., Lönnerdal B. Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant human lactoferrin and lysozyme in Peruvian children with acute diarrhea // Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 2007. № 44. P.258–264.
4. Lizzi A.R., Carnicelli V., Clarkson M.M., Di Giulio A., Oratore A. Lactoferrin derived peptides: mechanisms of action and their perspectives as antimicrobial and antitumoral agents // Mini Rev. Med. Chem. 2009. V. 9. № 6. P.687–695.
5. Wakabayashi H, Takase M, Tomita M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin // Curr Pharm Des. 2003. V. 9. № 16. P. 1277–1287.
6. Zimecki M, Kruzel ML. Milk – derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. (Review) // T. Exp. Ther. Oncol. 2007. V. 2. № 6. P. 89–106.
7. Самохина Л.С., Комолова Г.С., Ионова И.И., Семенов Г.В. Противоязвенное действие лактоферрина и его гидролизатов // Хранение и переработка сельхозсырья. 2012. № 9. С.21–23.
8. Самохина Л.С., Комолова Г.С., Ганина В.И., Ионова И.И., Семенов Г.В. Противодисбактериозное действие композиции гидролизатов α -лактальбумина и лактоферрина // Известия вузов. Пищевая технология. 2012. № 5–6. С.17–20.
9. Самохина Л.С., Головин М.А., Комолова Г.С., Ганина В.И., Ионова И.И., Шаталова Е.С. Антибактериальная активность лактоферрина из коровьего молока // Молочная промышленность. 2012. № 7. С. 56–57.
10. Самохина Л.С., Шаталова Е.С. Выделение и идентификация препарата лактоферрина // Живые системы и биологическая безопасность населения: Материалы 8-й Междунар. науч. конф. студентов и молодых учёных. М.: МГУПБ. 2010. С. 20–21.

Поступила 11 ноября 2015 г.

BIFIDOGENIC PROPERTIES OF LACTOFERRIN PEPTIDES OF COW MILK

© Authors, 2016

L.S. Samokhina

Ph.D. (Biol.), Research Scientist, Bach Institute of Biochemistry RAS (Moscow)

E-mail: 6423918@mail.ru

V.I. Ganina

Dr.Sc. (Eng.), Professor, K.G. Razumovsky Moscow State University of Technologies (First Cossak University)

E-mail: vigan5428@yandex.ru

I.I. Ionova

Ph.D. (Eng.), Associate Professor, Moscow State University of Food Production

E-mail: inna-ionova@yandex.ru

G.S. Komolova

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Leading Research Scientist, Bach Institute of Biochemistry RAS (Moscow)

E-mail: KomolovaGS@yandex.ru

M.A. Golovin

Post-graduate Student, Moscow State University of Food Production

E-mail: golovin787@ya.ru

Lactoferrin (LF) has been the focus of intense research lately. Lactoferrin is an 80 kDa iron-binding glycoprotein of the transferrin family that is expressed in most biological fluids and is a major component of the mammalian innate immune system. Cow's milk whey protein lactoferrin is known as multifunctional protective factor. Lactoferrin possess antimicrobial, antiviral, antioxidant, antineoplastic and anti-inflammatory activity. While being broken down in the gastrointestinal tract, the proteins form peptides that can significantly differ from original polypeptides in physiological properties. Great interest in study of the protective properties of lactoferrin peptides is noticed recently. They appeared to be more active than original native protein. Peptide complex marked as IVLF was isolated from bovine lactoferrin by pepsin hydrolysis. Mass spectrometric researches showed, that the complex consists of 7 peptides with molecular weight less than 3kDa. Their length doesn't exceed 18 amino acid residues. Animal experimentation shows, that it prevents the formation of chemically induced ulcers in stomach and the development of bowel bacteria overgrowth while using antibiotics. The article studies the influence of the low molecular weight peptide complex obtained by pepsin proteolysis of lactoferrin from cow's milk, on productively significant strains of bifidobacteria, used in dairy industry: *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium adolescentis*. The peptide complex increased the growth of the most bifidobacteria strains in the dose range of 100 to 1000 g/cm³ dose-dependently. There was elucidated the most pronounced growth reaction by strain *Bifidobacterium adolescentis* B-1. The peptide complex influenced more effective than native lactoferrine at the bifidobacteria growth. The growth activated strain *Bifidobacterium adolescentis* B-1 showed antimicrobial activity against pathogenic strain of *Escherichia* spp.

Key words: lactoferrin cow's milk, low-molecular peptide complex of lactoferrin, bifidobacteria, antimicrobial activity against of *Escherichia* spp.

References

1. Samokhina L.S., Shatalova E.S. Allocation and indification of lactoferrin drug // Living systems and biological safety of population: Proceedings of the 8th International Conference of Students and Young Scientists M. MSAAB. 2010. P. 20–21.
2. Samokhina L.S., Golovin M.A., Komolova G.S., Ganina V.I., Ionova I.I., Shatalova E.S. Antioxidant activity of peptides from cow milk lactoferrin. // Dairy Industry. 2012. V. 7. P. 56–57.
3. Samokhina L.S., Komolova G.S., Ionova I.I., Semenov G.V. Antiulcer effect of lactoferrin and its hydrolyzates // Storage and processing of farm products. 2012. №. 9. P. 21–23.
4. Samokhina L.S., Komolova G.S., Ganina V.I., Ionova I.I., Semenov G.V. Antidysbacteriosis effect of α -lactalbumin and lactoferrin hydrolysates composition // News of institutes of higher education. Food technology. 2012. № 5–6. P. 17–21.
5. Lizzi A.R., Carnicelli V., Clarkson M.M., Di Giulio A., Oratore A. Lactoferrin derived peptides: mechanisms of action and their perspectives as antimicrobial and antitumoral agents // Mini Rev Med Chem. 2009. № 6.
6. Pierce A, Legrand D, Mazurier J. Lactoferrin: a multifunctional protein // Med. Sci. (Paris). 2009. № 4.
7. Tomita M., Wakabayashi H., Shin K., Yamauchi K., Yaeshima T., Iwatsuki K. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications // Biochimie. 2009. № 1.
8. Wakabayashi H, Takase M, Tomita M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin // Curr Pharm Des. 2003. № 16.
9. Zimecki M, Kruzel ML. Milk –derived proteins and peptides of potential therapeutic and nutritive value. (Review) // T. Exp. Ther. Oncol. 2007. № 2.
10. Zavaleta N., Figueroa D., Rivera J., Sánchez J., Alfaro S., Lönnerdal B. Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant human lactoferrin and lysozyme in Peruvian children with acute diarrhea. // Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 2007. № 44. P. 258–264.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Алпизарин (таблетки, мазь), рег. №№ 85/507/2; 85/507/10; 85/507/16 – противовирусное средство, получаемое из травы копеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.) или копеечника желтеющего (*Hedysarum flavescens* Rerel et Schmalh).

По сравнению с ацикловиром обладает более широким спектром действия.

Аммифурин (таблетки, спиртовой раствор), рег. №№ 83/914/9; 70/151/47; 70/151/48 – фотосенсибилизирующее средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Анмарин (линимент, гель, лосьон (раствор)), рег. №№ 90/248/1; 95/178/5; 90/248/4 – антифугнальное, противогрибковое средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Гипорамин (таблетки, мазь, суппозитории, лиофилизат), рег. №№ 98/305/1; 98/305/10; 98/305/12 – противовирусное средство, получаемое из листьев облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.)

Глицирам (таблетки, гранулы), рег. №№ 76/252/7; 70/730/48; 88/542/3 – оказывает противовоспалительное стимулирующее действие на кору надпочечников, умеренно отхаркивающее средство, получаемое из корней и корневищ солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

Уважаемые читатели!

**Обращаем Ваше внимание, что подписаться на журнал
можно с любого месяца по каталогам:
«Роспечать» — подписной индекс 47284,
«Пресса России» — подписной индекс 12181,
а также непосредственно в Издательстве по адресу:
119048, Москва, ул. Усачева, д. 11.
Тел/факс: (499) 246-79-83.
Тел: (499) 246-84-02.
E-mail: verstka@rusvrach.ru.
Web-site: rusvrach.ru**