



2019 Том / Volume VII

№ 5

Научно-практический журнал
Scientific and Practical Journal

ISSN 2307-9266
e-ISSN 2413-2241

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACY & PHARMACOLOGY



Обзоры, лекции
Reviews, Lectures

Фармакогнозия, ботаника
Pharmacognosy, Botany

**Фармацевтическая технология
и биотехнология**
Pharmaceutical Technology
and Biotechnology

**Фармацевтическая
и токсикологическая химия**
Pharmaceutical and Toxicological
Chemistry

**Фармакология и клиническая
фармакология**
Pharmacology and Clinical
Pharmacology

**Информационные технологии
в фармации**
Information Technologies in Pharmacy

**Организация и экономика
фармацевтического дела**
Organization and Economy
of Pharmacy

**Экономика и менеджмент
медицины**
Economy and Management
of Medicine

Фармацевтическое образование
Pharmaceutical Education

Краткие сообщения
Brief Reports

**Дискуссии, рецензии, юбилеи,
научные школы, история
фармации и фармакологии**
Discussions, Referee Reports,
Anniversaries, Schools
of Thought, History
of Pharmacy and
Pharmacology



Научно-практический журнал

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Периодичность 6 номеров в год

Том 7, Выпуск 5, 2019

Свидетельство регистрации СМИ:
ПИ №ФС77–67428 от 13.10.2016 г.

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Главный редактор

Петров Владимир Иванович академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Заместители главного редактора

Озеров Александр Александрович доктор химических наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Воронков Андрей Владиславович доктор медицинских наук, профессор, г. Пятигорск, Россия

Редакционная коллегия

Фармакогнозия, ботаника

Куркин Владимир Александрович доктор фармацевтических наук, профессор, г. Самара, Россия

Зилфикаров Ифрат Назимович профессор РАН, доктор фармацевтических наук, г. Москва, Россия

Фармацевтическая технология и биотехнология

Саканян Елена Ивановна доктор фармацевтических наук, профессор, г. Москва, Россия

Фармацевтическая и токсикологическая химия / Информационные технологии в фармации

Вавер Илона PhD, профессор, г. Варшава, Польша

Фармакология и клиническая фармакология

Ханферьян Роман Авакович доктор медицинских наук, профессор, г. Москва, Россия

Буске Паскаль MD, профессор, г. Страсбург, Франция

Кампизи Коррадино профессор, MD, PhD, г. Генуя, Италия

Организация и экономика фармацевтического дела / Экономика и менеджмент медицины

Наркевич Игорь Анатольевич доктор фармацевтических наук, профессор, г. Санкт-Петербург, Россия

Сомасундарам Субраманиан MD, Россия/Индия

Статьи, представленные в разделы **Обзоры, лекции / Фармацевтическое образование / Краткие сообщения / Дискуссии, рецензии, юбилеи, научные школы, история фармации и фармакологии** могут быть рассмотрены любыми членами редакционной коллегии.

Ответственный секретарь: Корянова Ксения Николаевна, кандидат фармацевтических наук, г. Пятигорск, Россия

Переводчик: Давыденко Любовь Григорьевна, кандидат филологических наук, доцент, г. Пятигорск, Россия

Технический редактор: Доценко Марина Александровна, г. Пятигорск, Россия

Учредитель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

Адрес издательства: 357532, г. Пятигорск, пр-т Калинина, 11.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России

Телефон: +7 (8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

www.pharmpharm.ru

Объединенный каталог. Пресса России. Газеты и журналы. Индекс 94183

Формат А4, тираж 1000 экз. Цена свободная.

Журнал «Фармация и фармакология» включен в перечень рецензируемых научных изданий, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, и в соответствии с пунктом 5 правил формирования перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (Перечень ВАК), Scopus, Web of Science (ESCI), РИНЦ, eLibrary, ВИНТИ, РГБ, КиберЛенинка, Соционет, EMBASE, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

Отпечатано в соответствии с предоставленными материалами в ООО «Амирит», 410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 88.

© ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, 2019
© Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, 2019
© Авторы, 2019

Scientific and Practical Journal

PHARMACY & PHARMACOLOGY

Scientific and practical journal

Volume VII, Issue 5, 2019

The mass media registration certificate:

ПИ №ФС77–67428 от 13.10.2016

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Editor-in-Chief

Vladimir I. Petrov

Academician RAS, PhD (Medicine), Professor, Volgograd, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Aleksandr A. Ozerov

PhD (Chemistry), Professor, Volgograd, Russia

Andrew V. Voronkov

PhD (Medicine), Professor, Pyatigorsk, Russia

Editorial Board

Pharmacognosy, Botany

Vladimir A. Kurkin

PhD (Pharmacy), Professor, Samara, Russia

Ifrat N. Zilfikarov

PhD (Pharmacy), Professor of the RAS, Moscow, Russia

Pharmaceutical Technology and Biotechnology

Elena I. Sakanyan

PhD (Pharmacy), Professor, Moscow, Russia

Pharmaceutical and Toxicological Chemistry / Information Technologies in Pharmacy

Iwona Wawer

PhD, Professor, Warsaw (Poland)

Pharmacology and Clinical Pharmacology

Roman A. Khanfer`yan

PhD (Medicine), Professor, Moscow, Russia

Pascal Bousquet

MD, PhD Professor, Strasbourg, France

Campisi Corradino

Professor, MD, PhD, Genoa, Italy

Organization and Economy of Pharmacy / Economy and Management of Medicine

Igor A. Narkevich

PhD (Pharmacy), Professor, Saint-Petersburg, Russia

Somasundaram Subramanian

MD, Russia/India

Manuscripts presented in sections **Reviews, Lectures / Pharmaceutical Education / Brief Reports / Discussions, Referee Reports, Anniversaries, School of Thought, History of Pharmacy and Pharmacology** can be considered by any members of the editorial board.

Executive Editor: Koryanova Ksenia N., PhD (Pharmacy), Pyatigorsk, Russia

Translator: Davydenko Lubov G., PhD (Philology), Associate Professor, Pyatigorsk, Russia

Technical editor: Dotsenko Marina A., Pyatigorsk, Russia

Founder: Volgograd State Medical University. 1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

Editors office address: 11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University

Phone number: +7(8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

www.pharmpharm.ru

Union catalogue. Russian Press / Newspapers and journals. Code 94183

A4 size, 1000 issues circulation. Price free

Journal "Pharmacy & Pharmacology" is recommended International Committee Of Medical Journal Editors and included in Higher Attestation Commission, Scopus, Web of Science (ESCI), Russian citation database, eLibrary, ARISTI (All-Russian Institute of Scientific and Technical Information), RSL (Russian State Library), CyberLeninka, Socionet, EMBASE, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

Printed in the LLC "Amirit" in accord with provided materials, 410004, Saratov, 88, Chernishevsky Str.

© Volgograd State Medical University, 2019

© Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –
branch of Volgograd State Medical University, 2019

©Authors, 2019

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS**Оригинальные статьи / Research Articles****Обзоры, лекции / Reviews, Lectures**

<i>Д.А. Коновалов, Н.М. Алиева</i>	<i>Dmitry A. Konovalov, Naida M. Alieva</i>
ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЛАВРА БЛАГОРОДНОГО (ОБЗОР).....244	PHENOLIC COMPOUNDS OF LAURUS NOBILIS (REVIEW)244
<i>А.В. Майорова, Б.Б. Сысеев, Ю.О. Иванкова, И.А. Ханалиева</i>	<i>A.V. Mayorova, B.B. Sysuev, J.O. Ivankova, I.A. Hanaliev</i>
КОЛЛАГЕНАЗЫ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ: СОВРЕМЕННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНАЗЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ260	COLLAGENASES IN MEDICAL PRACTICE: MODERN COLLAGENASE-BASED PREPARATIONS AND PROSPECTS FOR THEIR IMPROVEMENT.....260
Фармацевтическая технология и биотехнология / Pharmaceutical Technology and Biotechnology	
<i>Н.Н. Бойко, Е.Т. Жилиякова, А.Ю. Малютина, Д.К. Наплеков, Н.Н. Шестопалова, Д.С. Марцева, О.О. Новиков, Д.И. Писарев, П.Г. Мизина</i>	<i>N.N. Boyko, E.T. Zhilyakova, A.Yu. Malyutina, D.K. Naplekov, N.N. Shestopalova, D.S. Martceva, O.O. Novikov, D.I. Pisarev, P.G. Mizina</i>
ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЦВЕТКОВ БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО МЕЖДУ ФАЗАМИ ЭКСТРАКЦИОННОЙ СИСТЕМЫ271	STUDY OF DISTRIBUTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM FLOWERS OF HELICHRYSUM ARENARIUM BETWEEN PHASES OF THE EXTRACTION SYSTEM.....271
<i>Ю.А. Полковникова, Н.А. Северинова, К.Н. Корянова, У.А. Тульская, М.В. Гречкина</i>	<i>Yu.A. Polkovnikova, N.A. Severinova, K.N. Koryanova, U.A. Tulskaia, M.V. Grechkina</i>
МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АЛЬГИНАТ-ХИТОЗАНОВЫХ МИКРОКАПСУЛ С ВИНПОЦЕТИНОМ279	MORPHOLOGICAL, TECHNOLOGICAL AND BIOPHARMACEUTICAL STUDIES OF ALGINATE-CHITOSAN MICROCAPSULES WITH VINPOCETINE279
Фармакология и клиническая фармакология / Pharmacology and Clinical Pharmacology	
<i>Д.В. Куркин, Е.И. Морковин, Н.А. Осадченко, Л.П. Кнышова, Д.А. Бакулин, Е.Е. Абросимова, Ю.В. Горбунова, И.Н. Тюренков</i>	<i>D.V. Kurkin, E.I. Morkovin, N.A. Osadchenko, L.P. Knyshova, D.A. Bakulin, E.E. Abrosimova, Yu.V. Gorbunova, I.N. Tyurenkov</i>
КОРРЕКЦИЯ ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ АЛКОГОЛЬНОГО ПОХМЕЛЬЯ У КРЫС АЦЕТИЛЦИСТЕИНОМ291	CORRECTION OF PSYCHOLOGICAL AND NEUROLOGICAL SIGNS OF ALCOHOL HANGOVER IN RATS WITH ACETYLCYSTEINE291
<i>Т.Ю. Оберган, Н.Ф. Мясоедов, М.Е. Григорьева, Л.А. Ляпина, Т.А. Шубина, Л.А. Андреева</i>	<i>T.Yu. Obergan, N.F. Myasoedov, M.E. Grigorjeva, L.A. Lyapina, T.A. Shubina, L.A. Andreeva</i>
КОМПЛЕКСНОЕ СОЕДИНЕНИЕ PRO-GLY-PRO-LEU С ГЕПАРИНОМ: ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИЙ, ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЙ И АНТИКОАГУЛЯНТНЫЙ ЭФФЕКТЫ У КРЫС С ГИПЕРГЛИКЕМИЕЙ300	COMPLEX COMPOUND OF PRO-GLY-PRO-LEU WITH HEPARIN: HYPOGLYCEMIC, FIBRINOLITIC AND ANTICOAGULANT EFFECTS IN RATS WITH HYPERGLYCEMIA.....300

УДК 582.673.41+633.824+547.56



ФЕНОЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ ЛАВРА БЛАГОРОДНОГО (ОБЗОР)

Д.А. Коновалов¹, Н.М. Алиева²

¹ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Дагестанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
367000, Россия, Республика Дагестан, г. Махачкала, пл. Ленина, 1.

E-mail: d.a.kononov@pmedpharm.ru

Получено 04.06.2019

Рецензия (1) 17.07.2019

Рецензия (2) 12.08.2019

Принята к печати 15.09.2019

Одним из самых известных растений семейства лавровые (Lauraceae) является лавр благородный (*Laurus nobilis* L.). **Целью** исследования являлся обзор научной информации по изучению фенольных соединений дикорастущего и культивируемого лавра благородного.

Материалы и методы. Исследование проводилось с использованием информационно-поисковых (PubMed, ScholarGoogle) и библиотечных баз данных (eLibrary, Cyberleninka), а также приложения ResearchGate для семантического поиска. Методы исследования – анализ и обобщение научной литературы за период с 2000 года по настоящее время.

Результаты. Представленные в обзоре данные показывают, что листья, плоды и побеги лавра благородного являются ценными источниками фенольных соединений, таких как фенольные кислоты, флавоноиды, проантоцианидины. Количественное содержание этих групп веществ варьирует в зависимости от места сбора, источника сырья (культивируемые или дикорастущие растения), времени (фазы) его заготовки, способа сушки, извлечения из сырья и т.д. Фенольные соединения проявляют выраженную антиоксидантную и антирадикальную активность, оказывают ингибирующее влияние на продукцию оксида азота, натрий-калиевую аденозинтрифосфатазу, на линии опухолевых клеток (HeLa, MCF7, NCI-H460 и HCT15), характеризуются антибактериальным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Заключение. Анализ доступной научной информации показал, что фенольные соединения лавра благородного являются одной из основных групп действующих соединений этого растения. Использование этих данных важно для разработки новых эффективных лекарственных средств на основе сырья лавра благородного.

Ключевые слова: лавр благородный, *Laurus nobilis*, фенольные соединения, количественное определение, антиоксидантная, противораковая активность

Для цитирования: Д.А. Коновалов, Н.М. Алиева. Фенольные соединения лавра благородного (обзор). *Фармация и фармакология*. 2019;7(5): 244-259. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-244-259

© Д.А. Коновалов, Н.М. Алиева, 2019

For citation: Dmitry A. Kononov, Naida M. Alieva. Phenolic compounds of *Laurus nobilis* (review). *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(5): 244-259. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-244-259

PHENOLIC COMPOUNDS OF LAURUS NOBILIS (REVIEW)

Dmitry A. Konovalov¹, Naida M. Alieva²

¹ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University
11, Kalinin ave., Pyatigorsk, Stavropol region, Russia 357532

² Dagestan State Medical University
1, Lenin sq., Makhachkala, Dagestan republic, Russia 367000

E-mail: d.a.konovalov@pmedpharm.ru

Received 4 June 2019

Review (1) 17 July 2019

Review (2) 12 August 2019

Accepted: 15 September 2019

One of the most famous plants of the laurel family (Lauraceae) is *Laurus nobilis* L.

The aim of the study was to review scientific information on the study of phenolic compounds of wild-growing and cultivated *Laurus nobilis* L.

Materials and methods. The study was performed using information retrieval (PubMed, ScholarGoogle) and library databases (eLibrary, Cyberleninka), as well as ResearchGate application for semantic search. The research methods are analysis and synthesis of the scientific literature data for the period from 2000 up to the present.

Results. The data presented in the review show that leaves, fruits, and shoots of *Laurus nobilis* L. are valuable sources of phenolic compounds, such as phenolic acids, flavonoids, and proanthocyanidins. The quantitative content of these groups of substances varies depending on the collecting ground, the source of raw materials (cultivated or wild plants), the time (phase) of their harvesting, the method of drying, extraction from raw materials, etc. Phenolic compounds exhibit a pronounced antioxidant and antiradical activity, have an inhibitory effect on NO production, sodium-potassium adenosine triphosphatase, on tumour cell lines (HeLa, MCF7, NCI-H460 and HCT15), and are characterised by an antibacterial action against gram-positive and gram-negative bacteria.

Conclusion. The analysis of the available scientific information showed that the phenolic compounds of *Laurus nobilis* L. are one of the main groups of the active compounds of this plant. The use of this information is essential for the development of new effective medicines based on the raw materials of *Laurus nobilis* L..

Keywords: *Laurus nobilis* L., phenolic compounds, quantification, antioxidant, anticancer activity

ВВЕДЕНИЕ

Семейство лавровых (*Lauraceae*) включает более 2500 видов растений, произрастающих в субтропиках и тропиках Восточной Азии, Южной и Северной Америки. Одним из самых известных и наиболее часто используемых растений из этого семейства является лавр благородный (*Laurus nobilis* L.). Название растения посвящено древнегреческому богу солнца Аполлону и является символом мира и победы. Из него делали венки для императоров, генералов и поэтов.

Естественными местами обитания этого вечнозелёного растения являются территории стран Средиземноморья с высоким годовым уровнем осадков [1]. Выращивается как декоративный вид в Европе, России, США и других странах, культивируется в Турции, Алжире, Марокко, Португалии, Испании, Италии, Франции, России и Мексике [2–4].

Листья лавра широко используются в традиционных блюдах народов не только Средиземноморских, но и многих других стран [5]. Листья и плоды растения применяются в традиционной медицине народов разных стран для снижения высокого уровня глюкозы в крови, при лечении заболеваний вызванных грибковыми и бактериальными инфекциями. Извлечения из листьев лавра проявляют про-

тивовоспалительные, успокаивающие, противоэпиплетические свойства [6–10]. Настой из сухих листьев используют при различных желудочно-кишечных заболеваниях, а также при метеоризме в качестве ветрогонного средства [11]. Плоды лавра были включены в шестой выпуск Российской Фармакопеи и в Государственную Фармакопею СССР первого издания. Листья лавра благородного являются официальным сырьём (*Lauri Folium*) в Иране [12].

Биологически активные соединения, содержащиеся в эфирном масле и извлечениях из листьев лавра благородного, как экспериментально установлено, способствуют заживлению мелких ран [13], обладают противовоспалительной, противоболевой [14], иммуностимулирующей [15], нейрозащитной [13, 16], антихолинергической, антиокислительной, противоязвенной, антиконвульсантной, антимутагенной, инсектицидной, антибактериальной, противовирусной, противогрибковой [13] и ларвицидной [17] активностью. Некоторые публикации посвящены характеристике противоракового потенциала эфирного масла [18], метанольного [19], этанольного и водного извлечения [20] из листьев и плодов лавра. В научной литературе описаны антибактериальные свойства эфирного масла [21–22], водного [23], эта-

нольного [24] и метанольного извлечений [25]. Антибактериальная активность извлечений, по мнению некоторых исследователей, связана с присутствием терпеновых и фенольных веществ [26–27]. Листья лавра также входят в состав сборов [28] и лекарственных средств для лечения диабета [29–30], а извлечения из них в состав биологически активных добавок для пищи [31]. Эфирное масло лавра используется в косметологии и в производстве духов и мыла.

Химический состав листьев исследовался достаточно широко в разных странах, где это растение произрастает в естественных местах обитания или культивируется. В предыдущих исследованиях в листьях и плодах лавра были обнаружены разные группы химических соединений. 1,8-Цинеол – главный компонент эфирного масла листьев лавра, что следует из результатов многих исследований с содержанием до 70% [32–33]. Плоды содержат жирное и эфирное масло, именно эта смесь была известна ранее под названием «масло лавра» и содержала в качестве одного из компонентов лауростеарин – эфир лауриновой кислоты. Состав жирных кислот плодов был изучен В. Ozcan с соавторами [7]. Корни и листья лавра благородного – источник сесквитерпеновых лактонов [34]. Два отчетливых химических типа, содержащие лауренобиолит и костунолит, как главные вещества, были идентифицированы в них [35–37]. У сесквитерпеновых лактонов, обнаруженных в лавровых листьях, установлены разные фармакологические свойства: ингибирование продукции NO [36] и поглощения этанола [38], повышение активности печёночной глутатион-S-трансферазы [3]. В последнее десятилетие активно изучается цитотоксическая активность этих соединений в отношении различных линий опухолевых клеток [39–40]. Достаточно часто исследовалась антиокислительная активность различных извлечений из листьев дикорастущего [10, 41–42] и культивируемого лавра [6, 11]. В последние годы появилось несколько обзорных работ, посвящённых биологически активным соединениям лавра благородного [13, 43]. Однако информация о накоплении в растении фенольных соединений в этих статьях представлена крайне ограниченно. Фенольные соединения листьев и плодов дикорастущего и культивируемого лавра изучались в разных регионах его

произрастания. Возрастающий интерес к этой группе природных соединений лавра связан не только с разнообразием идентифицированных структур, но и с актуальными видами фармакологической активности (антиокислительной и противораковой), которые с ней связывают.

ЦЕЛЬЮ исследования являлся обзор научной информации по изучению фенольных соединений дикорастущего и культивируемого лавра благородного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось с использованием информационно-поисковых (PubMed, ScholarGoogle,) и библиотечных баз данных (eLibrary, Cyberleninka), а также приложения ResearchGate для семантического поиска. Методы исследования – анализ и обобщение научной литературы за период с 2000 года по настоящее время.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании Н.В. Kang с соавторами [44] этанольное извлечение из листьев лавра оказалось цитотоксичным в отношении *Staphylococcus aureus* 209p и обладало самой высокой алкилперокси-радикалулавливающей (ROO•) активностью среди 120 видов изученных растений. После обработки этого извлечения хлороформом, этилацетатом, н-бутанолом и водой, наибольшую активность показала этилацетатная фракция. Из неё авторы выделили главный флавонол листьев растения, который по спектральным характеристикам был идентифицирован как изокверцитрин (1) (см. табл. 1). Дальнейшее изучение антиоксидантной активности этого соединения установило, что она сопоставима с активностью известных антиоксидантов, таких как эпигаллокатехин, ресвератрол и выше, чем у бутилгидроксанизола, бутилгидрокситолуола и аскорбиновой кислоты.

Из метанольного извлечения свежих листьев лавра S. de Marino с соавторами [45] выделили несколько соединений, в том числе фенольный глюкозид (2) и флавоноиды (3 и 4). Изучение влияния этих веществ на продукцию оксида азота в активированных липополисахаридом крысиных макрофагах (J774) показало, что наиболее активен из них кемпферол-3-O- α -L-(3",4"-ди-Е-п-кумароил) рамнозид (3).

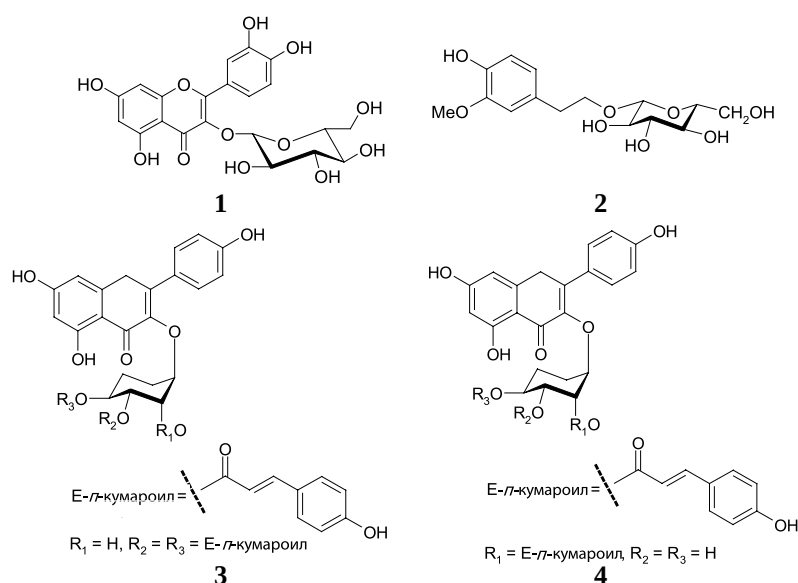


Таблица 1 – Фенольные соединения лавра благородного

№ п/п	Группа веществ / название соединения	Морфологическая часть растения	Содержание, %	Фармакологическая активность	Ссылка
Флавоноиды					
1.	Изокверцитрин (1)*	Листья	++	Антиоксидантная активность	[44]
2.	Кемпферол-3-О- α -L-(3'',4''-ди-E- <i>p</i> -кумароил) рамнозид (3)	Листья	0,00027	Ингибитор продукции оксида азота в активированных липополисахаридами крысиных макрофагах (J774)	[45]
3.	Кемпферол-3-О- α -L-(2''-E- <i>p</i> -кумароил) рамнозид (4)	Листья	0,00022	—***	[45]
4.	Лютеолин (9)	Листья	до 0,45 $\pm$ 0,05 (в пересчете на сухой вес)	—	[48]
5.	Кемпферол-3-О-глюкопиранозид (16)	Листья	0,0092	Антиоксидантная активность	[11]
6.	Кемпферол-3-О-рамнопиранозид (17)	Листья	0,00112	Антиоксидантная активность	[11]
7.	Кемпферол-3-О-(2'',4''-ди-E- <i>p</i> -кумароил)-рамнозид (18)	Листья	0,00916	Антиоксидантная активность	[11]
8.	Кемпферол-3-О-арабинопиранозид (19)	Листья	0,0064	Антиоксидантная активность	[11]
9.	Кемпферол-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозид] (20)	Листья	0,00112	Антиоксидантная активность	[11]
10.	Кверцетин-3-О-глюкопиранозид (21)	Листья	0,0152	Антиоксидантная активность	[11]
11.	Кверцетин-3-О-рамнопиранозид (22)	Листья	0,0084	Антиоксидантная активность	[11]
12.	Кверцетин-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозид] (23)	Листья	0,0062	Антиоксидантная активность	[11]
13.	3'-Метокси-кверцетин-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозид] (24)	Листья	0,00488	Антиоксидантная активность	[11]
14.	3'-Метокси-кверцетин-3-О-глюкопиранозид (25)	Листья	0,008	Антиоксидантная активность	[11]
15.	Изовитексин 2''-рамнозид (27)	Листья	0,00536	Антиоксидантная активность	[11]
16.	Рутин (29)	Листья	0,0929 $\pm$ 0,19 (в пересчете на сухой вес)	Антиоксидантная активность	[54]
17.	Кемпферол-3-О- α -L-(3''-Z, 4''-E-ди- <i>p</i> -кумароил)-рамнопиранозид (30)	Листья	0,000627	Ингибитор натрий-калиевой аденозинтрифосфатазы. Антибактериальная активность в отношении <i>St. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Pr. vulgaris</i>	[55]

Продолжение таблицы 1

№ п/п	Группа веществ / название соединения	Морфологи- ческая часть растения	Содержание, %	Фармакологическая активность	Ссыл- ка
18.	Кемпферол-3-О-α-L-(3", 4"-ди-Z-п-кумароил)-рамнопирано- зид (31)	Листья	0,000307	Ингибитор натрий-калиевой аде- нозинтрифосфатазы. Антибактери- альная активность в отношении <i>St.</i> <i>aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. typh-</i> <i>imurium</i> , <i>Pr. vulgaris</i>	[55]
19.	Кемпферол-3-О-α-L-(3", 4"-ди-E-п-кумароил)-рамнопирано- зид (32)	Листья	0,00243	Ингибитор натрий-калиевой аде- нозинтрифосфатазы. Антибактери- альная активность в отношении <i>St.</i> <i>aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. typh-</i> <i>imurium</i> , <i>Pr. vulgaris</i>	[55]
20.	Кемпферол-3-О-α-L-(2"-E, 4"-Z-ди-п- кумароил)-рамнопиранозид (33)	Листья	0,00275	Ингибитор натрий-калиевой аде- нозинтрифосфатазы. Антибактери- альная активность в отношении <i>St.</i> <i>aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. typh-</i> <i>imurium</i> , <i>Pr. vulgaris</i>	[55]
21.	Кемпферол-3-О-α-L-(2", 4"-ди-E-п-кумароил)-рамнопира- нозид (34)	Листья	0,0105	Ингибитор натрий-калиевой аде- нозинтрифосфатазы. Антибактери- альная активность в отношении <i>St.</i> <i>aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. typh-</i> <i>imurium</i> , <i>Pr. vulgaris</i>	[55]
22.	Кемпферол-3-О-α-L-(2"-Z, 4"-E-ди-п- кумароил)-рамнопиранозид (35)	Листья	0,00349	Ингибитор натрий-калиевой аде- нозинтрифосфатазы. Антибактери- альная активность в отношении <i>St.</i> <i>aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. luteus</i> , <i>S. typh-</i> <i>imurium</i> , <i>Pr. vulgaris</i>	[55]
23.	2',β-Дигидроксид-α,β-дигидрохал- кон-α-О-гексозид (37)	Листья	+	—	[56]
24.	2'-Гидроксид-α,β-дигидрохал- кон-α-О-гексозид (40)	Листья	+	—	[56]
25.	Апигенин-6,8-ди-С-гексозид (41)	Листья	+	—	[56]
26.	Апигенин-6-С-(2"-О-деоксигексо- зил)-гексозид (42)	Листья	+	—	[56]
27.	8-С-Гексозид апигенина (43)	Листья	+	—	[56]
28.	Кверцетин-3-О-(6"-О-деоксигексо- зил)-гексозид (44)	Листья	+	—	[56]
29.	Тетраметокси-дигидрокверце- тин-3-О-пентозид (45)	Листья	+	—	[56]
30.	Кемпферол-3-О-(6"-О-деоксигексо- зил)-гексозид (46)	Листья	+	—	[56]
31.	Кверцетин-3-О-гексозид (изомер 1 и 2) (47)	Листья	+	—	[56]
32.	Изорамнетин-3-О-(6"-О-деоксигексо- зил)-гексозид (48)	Листья	+	—	[56]
33.	Кверцетин-3-О-пентозид (49)	Листья	+	—	[56]
34.	Кемпферол-3-О-гексозид (50)	Листья	+	—	[56]
35.	Кверцетин-3-О-деоксигексозид (51)	Листья	+	—	[56]
36.	Изорамнетин-3-О-гексозид (52)	Листья	+	—	[56]
37.	Кемпферол-3-О-пентозид (53)	Листья	+	—	[56]
38.	Кемпферол-3-О-деоксигексозид (54)	Листья	+	—	[56]
39.	Лютеолина 6-С-глюкозид (59)	Листья	+	—	[57]
40.	Апигенина 8-С-глюкозид (60)	Листья	+	—	[57]
41.	Апигенина 6-С-глюкозид (61)	Листья	+	—	[57]
42.	Кверцетина 3-О-глюкозид (62)	Листья	+	—	[57]
43.	Кемпферола 3-О-рутинозид (63)	Листья	+	—	[57]

Окончание таблицы 1

№ п/п	Группа веществ / название соединения	Морфологи- ческая часть растения	Содержание, %		Фармакологическая активность	Ссыл- ка
44.	Кемпферола 3-О-глюкозид (64)	Листья	+	–		[57]
Фенольные кислоты						
45.	3,4-Дигидроксibenзойная кислота (10)	Листья	до 5,0±0,4 (в пересчете на сухой вес)	–		[48]
46.	Галловая кислота (11)	Листья	до 1,40±0,15 (в пересчете на сухой вес)	Антиоксидантная активность		[48]
		Плоды	0,02	–		[61]
47.	Ванилиновая кислота (12)	Листья	до 1,40±0,15 (в пересчете на сухой вес)	Антиоксидантная активность		[48, 52]
48.	Розмариновая кислота (13)	Листья	до 0,02 (в пересчете на сухой вес)	Антиоксидантная активность		[48]
49.	Кофейная кислота (14)	Листья	+	Антиоксидантная активность		[52]
50.	Феруловая кислота (15)	Листья	+	Антиоксидантная активность		[52]
51.	3,4-Дигидроксibenзойной кислоты гексозид (36)	Листья	+	–		[56]
52.	Кумаровой кислоты гексозид (39)	Листья	+	–		[56]
53.	Кумаровая кислота (65)	Листья	+	–		[59]
54.	2-Гидроксциннамовая кислота (66)	Листья	+	–		[59]
Антоцианины						
55.	Цианидин 3-О-глюкозид (5)	Плоды	0,56	–		[47]
56.	Цианидин 3-О-рутинозид (6)	Плоды	0,73	–		[47]
57.	Пеонидин 3-О-глюкозид (7)	Плоды	0,0063 в сум- ме	–		[47]
58.	Пеонидин 3-О-рутинозид (8)	Плоды	+	–		[47]
Фенольные гликозиды						
59.	Фенольный гликозид / 2-(4-ги- дрокси-3-метоксифенил)-э- тил-О-β-D-глюкопиранозид (2)	Листья	0,00032	–		[45]
60.	Фенольное соединение / 1-(2'-ги- дроксифенил)-1-гидроксифенил- пропан-α-О-гексозид (38)	Листья	+	–		[56]
Флаван-3-олы						
61.	Катехин (26)	Листья	0,00916	Антиоксидантная активность		[11]
			1,06	–		[61]
62.	Эпикатехина гексозид (55)	Листья	+	–		[57]
63.	(+)-Галлокатехин (56)	Листья	+	–		[57]
64.	(+)-Катехин (57)	Листья	+	–		[57]
65.	(-)-Эпикатехин (58)	Листья	+	–		[57]
66.	Эпикатехин (67)	Листья	1,29	–		[61]
		Плоды	0,65			
67.	Эпигаллокатехин (68)	Листья	0,40	–		[61]
		Плоды	0,51			
68.	Эпикатехингаллат (69)	Плоды	0,16	–		[61]
69.	Циннамтаннин В1 (28)	Листья	0,00092	Антиоксидантная активность		[11]

Примечание:

* – номер соединения в тексте статьи;

** – вещества обнаружены в указанном объекте, но количественное содержание не установлено;

*** – активность этого соединения в данном исследовании не определялась.

Метанольные извлечения пяти видов растительного сырья, приобретённых в Droga (Portoroz, Словения), в том числе листья лавра, были исследованы группой авторов [46]. Сумма фенольных соединений определялась колориметрическим методом с использованием реактива Folin–Ciocalteu. В извлечении из листьев лавра их содержание составило 99,7 г/кг (в пересчёте на галловую кислоту). Проантоцианидины в гидролизированных кислотой извлечениях исследовались спектрофотометрически при длине волны 540 нм (в сумме 29,9 г/кг). Свободные флавоны (апигенин и лютеолин) и флавонолы (кемпферол, мирицетин и кверцетин) в гидролизированных извлечениях определяли методом ВЭЖХ. Детектирование проводилось при 367 нм с использованием стандартных образцов апигенина, лютеолина, кверцетина, мирицетина и кемпферола в качестве внешних стандартов. Авторами были идентифицированы кверцетин и кемпферол. Содержание флавоноидов (в сумме) составило 80,1 мг/кг.

Состав антоцианов, выделенных из очищенных от семян плодов лавра, был впервые определен L. Longo и G. Vasapollo [47]. Соединения выделялись 0,1% водным раствором метанола подкисленным хлористоводородной кислотой с последующей очисткой извлечения в твердофазном картридже C-18 и идентифицировались с помощью ВЭЖХ-МС анализа. Содержание антоцианов в плодах составила 217 мг/г. Главные антоцианы – цианидин 3-О-глюкозид (5,90 мг/г, т.е. 41% от суммы) и цианидин 3-О-рутинозид (6,116 мг/г – 53%). Кроме того, два минорных антоциана идентифицированы как 3-О-глюкозид (7) и 3-О-рутинозид пеонидина (8) (10,6 мг/г, т.е. 5% от суммы) (см. табл. 1).

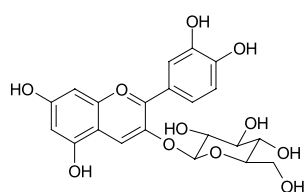
Собранные в первой половине февраля, мае, августе и ноябре 2007 г. в области Patra (Греция) листья лавра V. Parageorgiou с соавторами разделили на две части. Одну часть образцов подвергли воздушно-тепловой сушке при температуре окружающей среды, а другую – сублимационной (в течение 6 часов при –60°C) [48]. Сумма фенольных соединений определялась колориметрическим методом с использованием реактива Folin–Ciocalteu [49] и галловой кислоты в качестве стандарта. Спектр поглощения относительно дистиллированной воды был измерен при 765 нм, а калибровочная кривая построена по галловой кислоте. Для определения содержания суммы флавоноидов также использовали колориметрию, а в качестве референтного вещества (–)-эпикатехин. Спектр смеси был измерен при 510 нм. Результаты показали существенное различие в содержании суммы фенольных соединений в зависимости от фазы развития растений. Сумма флавоноидов в экстракте из листьев лавра, собранных в мае (начало плодоношения) составила 2,90 мг/г в пересчёте на (–)-эпикатехин и сухое сырьё. Сумма фенольных соединений достигала максимального уровня во время стадии

начала плодоношения (80,30 мг в пересчёте на галловую кислоту / г сухого сырья), тогда как самое низкое содержание отмечалось в конце плодоношения (22,90 мг/г в пересчёте на галловую кислоту и сухое сырьё). Эти результаты значительно отличались от данных установленных во время полного цветения (51,30 мг/г в пересчёте на галловую кислоту и сухое сырьё) и в стадию бутонизации (42,60 мг/г в пересчёте на галловую кислоту и сухое сырьё). Извлечения лавра, полученные из сублимационно-высушенного сырья, продемонстрировали подобную сезонную вариацию. Главными фенольными компонентами во всех исследованных извлечениях являлись флавоноиды. Концентрация лютеолина (9) была относительно высока (в пределах от 0,20 до 4,50 мг/г сухого веса). Фенольные кислоты – 3,4-дигидроксibenзойная (10), галловая (11), ванилиновая (12) и розмариновая (13) обнаружены в низких концентрациях (см. табл. 1). Сублимационная сушка вызвала существенное уменьшение (почти на 50%) суммы фенольных соединений и флавоноидов практически во всех изученных образцах листьев лавра. В значительной степени это было связано с уменьшением содержания лютеолина и большинства фенольных кислот (главным образом гидроксициннамовых). Этот результат исследования согласуется с данными других авторов, в соответствии с которыми сублимационная сушка вызвала потерю 87% суммы флавонолов в экстрактах *Posidonia oceanica* L. [50].

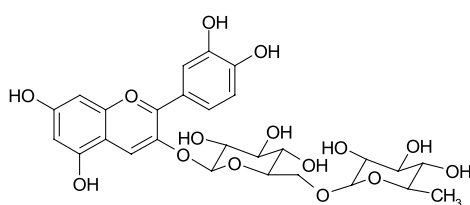
О подобных изменениях, то есть, разрушении гидроксициннамовых кислот и флавоноидов и увеличении содержания галловой кислоты было известно и ранее, но не были установлены причины [51]. Вполне возможно, как считают авторы, к потере в содержании гидроксициннамовых кислот и флавоноидов могла привести стадия размораживания растительного материала после сублимационной сушки.

М. Muchuweti с соавторами [52], применив высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), установил присутствие кофейной (14), феруловой (15) и ванилиновой (12) кислот в извлечениях из листьев лавра (см. табл. 1).

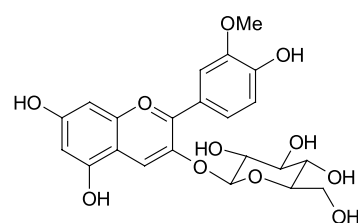
Антиокислительная активность и сумма фенольных соединений некоторых специй (*Mentha piperita* L., *Rhus coriaria* L., *Thymbra spicata*, *Salvia officinalis*, *Rosmarinus officinalis* L., *Capparis ovata* L., *Origanum vulgare* L., *Laurus nobilis* L. и *Capsicum annum* L.) были определены А. Ünver с соавторами [53]. Наивысшие значения антиоксидантной активности в единицах TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) были получены для шалфея (1,783) и розмарина (1,241). Для извлечения из листьев лавра она составила $1,001 \pm 0,020$ ммоль TE/g извлечения. Значения антирадикальной активности (IC_{50} , мг/мл) – $1,901 \pm 0,034$ мг/мл. Сумма фенольных соединений (колориметрия с реактивом Folin–Ciocalteu) составила $288,15 \pm 1,34$ мг/г извлечения в пересчёте на галловую кислоту.



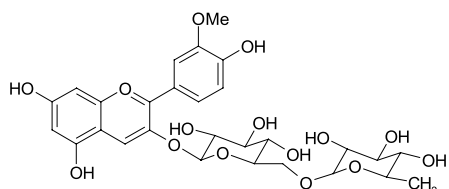
5



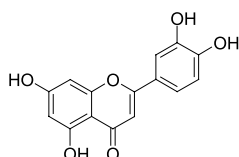
6



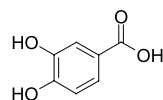
7



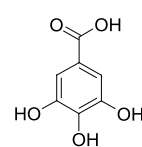
8



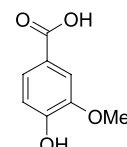
9



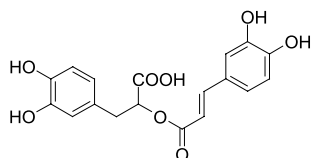
10



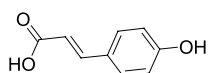
11



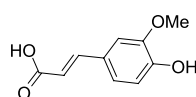
12



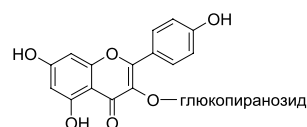
13



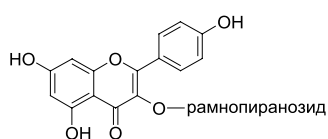
14



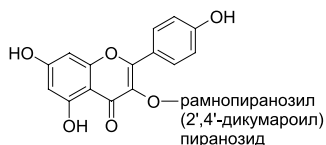
15



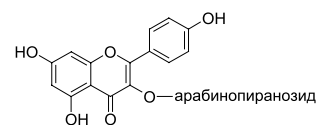
16



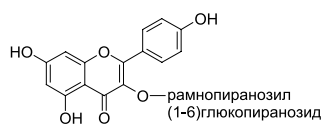
17



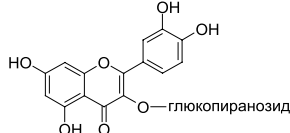
18



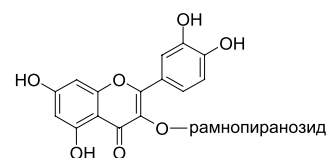
19



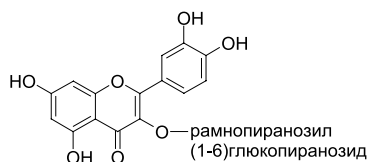
20



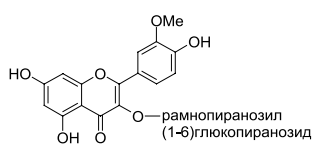
21



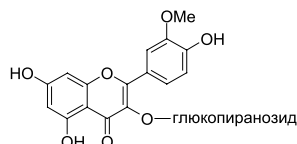
22



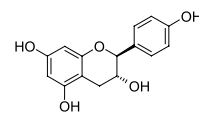
23



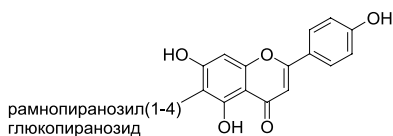
24



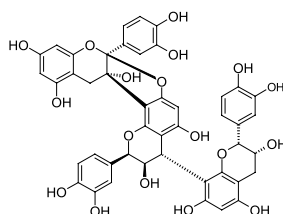
25



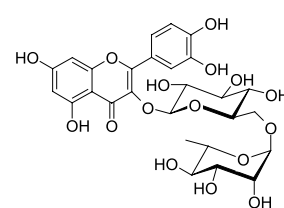
26



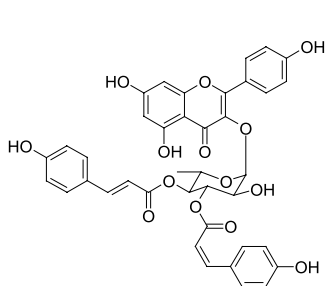
27



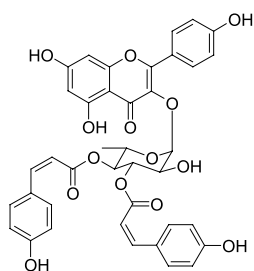
28



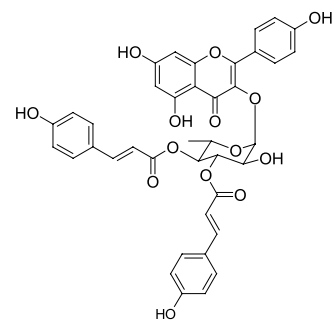
29



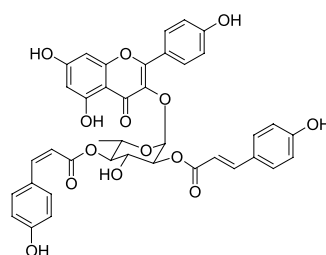
30



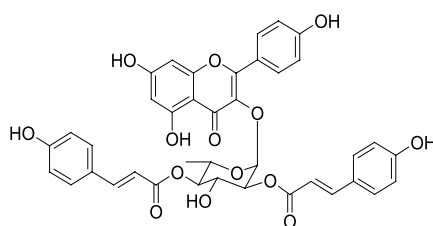
31



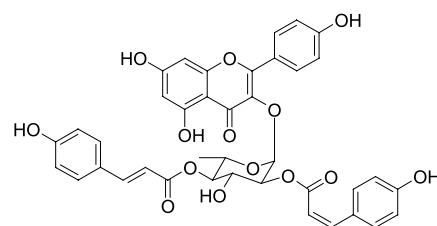
32



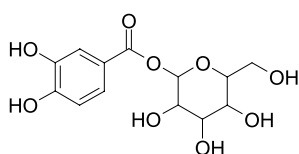
33



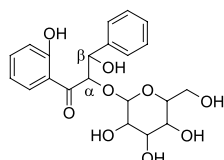
34



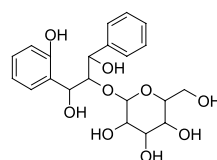
35



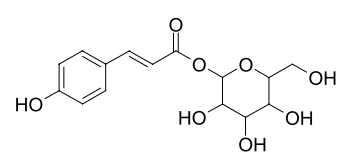
36



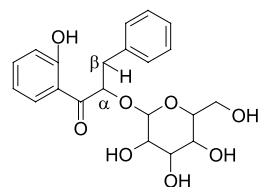
37



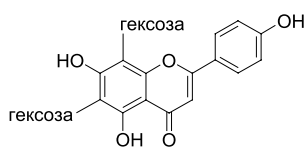
38



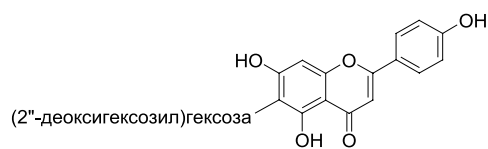
39



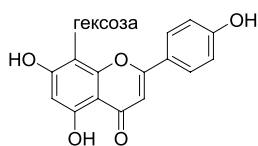
40



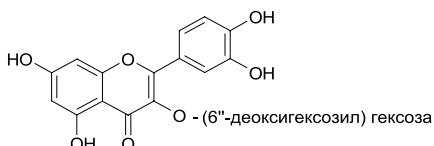
41



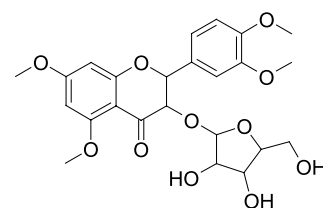
42



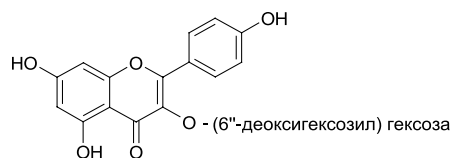
43



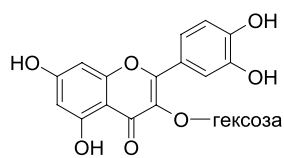
44



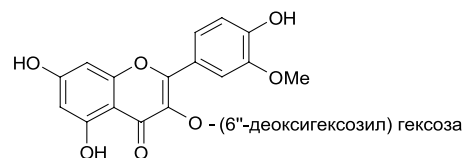
45



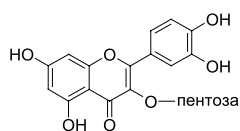
46



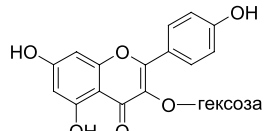
47



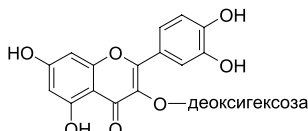
48



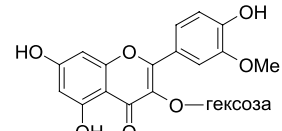
49



50



51



52

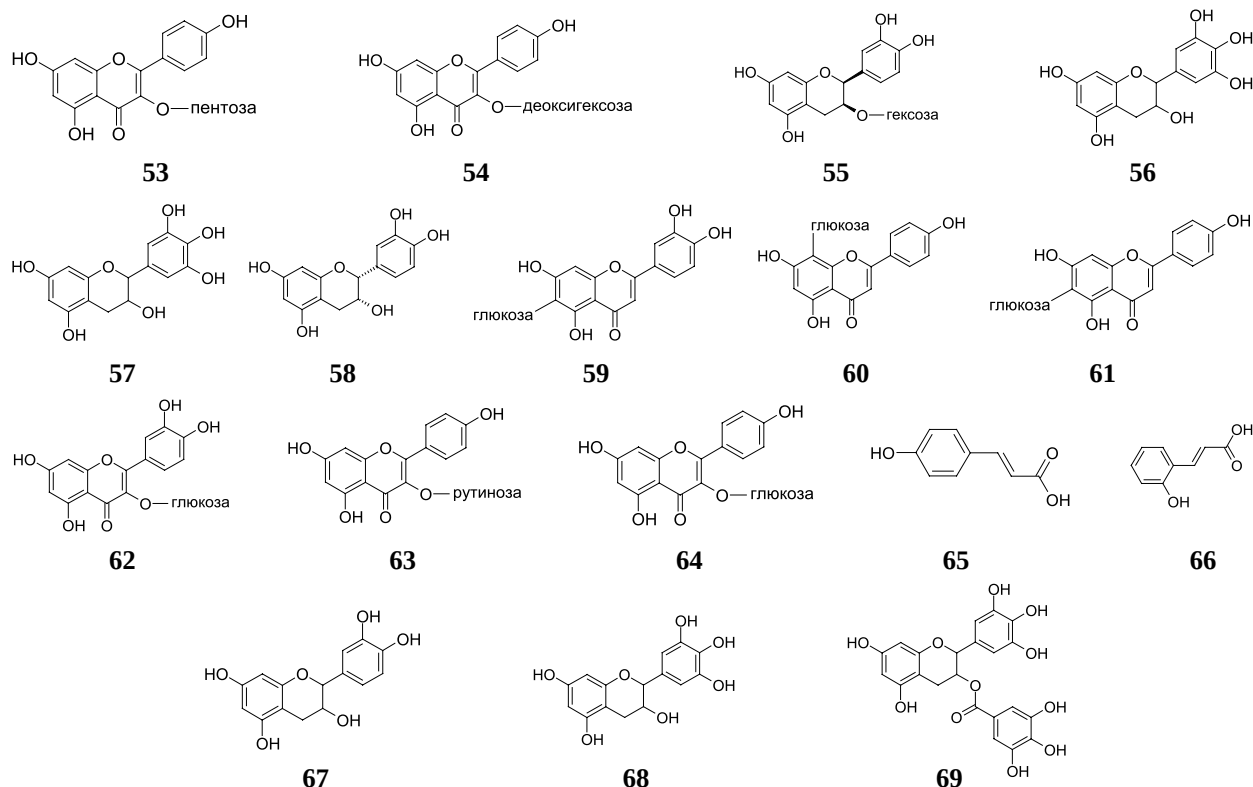


Таблица 2 – Содержание суммы флавоноидов в извлечениях из листьев лавра по Kaurinov с соавторами [42]

Содержание суммы флавоноидов (мг/г) в извлечениях				
этанольное	хлороформное	этилацетатное	бутанольное	водное
0,76	1,02	1,56	1,07	0,68

Таблица 3 – Антирадикальная активность извлечений из листьев лавра по Kaurinov с соавторами [42]

Радикалы	IC ₅₀ (мкг/см ³)				
	Извлечение				
	этанольное	хлороформное	этилацетатное	бутанольное	водное
DPPH*	127,38	139,42	83,24	181,35	161,83
O ₂ ^{•-}	327,60	429,43	163,57	288,64	486,32
NO	168,77	322,84	158,63	386,80	618,42

Примечание: * – DPPH – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил

Таблица 4 – Ингибирующая активность гликозидов кемпферола из листьев лавра в отношении натрий-калиевой аденозинтрифосфатазы по Lee с соавторами [55]

№	Соединения	IC ₅₀ (мкМ)
1 (30)*	Кемпферол-3-O-α-L-(3''-Z, 4''-E-ди-п-кумароил)-рамнопиранозид	6,4±0,3
2 (31).	Кемпферол -3-O-α-L-(3'', 4''-ди-Z-п-кумароил)-рамнопиранозид	10,4±0,6
3 (32).	Кемпферол-3-O-α-L-(3'',4''-ди-E-п-кумароил)-рамнопиранозид	5,0±0,1
4 (33).	Кемпферол-3-O-α-L-(2''-E,4''-Z-ди-п-кумароил)-рамнопиранозид	4,0±0,1
5 (34).	Кемпферол-3-O-α-L-(2'',4''-ди-E-п-кумароил)-рамнопиранозид	5,2±0,2
6 (35).	Кемпферол-3-O-α-L-(2''-Z,4''-E-ди-п-кумароил)-рамнопиранозид	5,1±0,1
7.	Кемпферол**	>669,3
8.	Афзелин**	>463,0
9.	п-Кумаровая кислота**	>1218,0
10.	Оубаин**	4,6±0,1

Примечание:

*- Цифра, указанная в скобках, соответствует номеру соединения в тексте.

**- Соединения, использованные в качестве образцов сравнения.

Таблица 5 – Группы фенольных соединений идентифицированные в листьях лавра и извлечениях из них (мг/г, n=18) [57]

Образец сырья/ извлечение	Количественное содержание фенольных соединений			
	Флаван-3-олы	Флавоны	Флавоноиды	Фенольные соединения
Культивируемый	*56 ± 8	4,4 ± 0,2	26 ± 2	86 ± 11
Дикорастущий	60 ± 4	2,6 ± 0,4	7 ± 2	71 ± 6
Метанольное извлечение	63,6 ± 0,4	4 ± 1	19 ± 10	86 ± 11
Водное извлечение	52 ± 5	3 ± 1	15 ± 9	70 ± 5

Примечание: * – среднее значение.

Таблица 6 – Результаты количественного определения фенольных соединений в листьях и побегах лавра благородного по Musienko и Kyslychenko [60]

№ п/п	Количественное содержание (x ± Δx), % в пересчёте на сухое сырьё (n=5)		
	окисляемые фенолы	гидроксикоричные кислоты	флавоноиды
Побеги			
1	4,80 ± 0,12	1,35 ± 0,08	0,85 ± 0,03
2	4,54 ± 0,17	1,29 ± 0,07	0,81 ± 0,07
Листья			
1	5,25 ± 0,16	1,73 ± 0,05	0,95 ± 0,06
2	5,04 ± 0,11	1,71 ± 0,05	0,91 ± 0,05

Примечание. 1 – образец из окрестностей г. Алушта, 2 – образец из окрестностей пос. Рыбачье.

Таблица 7 – Количественное содержание фенольных соединений и флавоноидов в листьях лавра благородного по Vinha с соавторами [62]

Извлечения	Фенольные соединения, мг/г в пересчёте на галловую кислоту	Флавоноиды, мг/г в пересчёте на эпикатехин
Водное	14,37±0,79	14,12±0,93
Спиртоводное (вода-этанол 1:1)	43,03±0,35	30,15±0,25
Спиртовое	31,09±0,31	20,88±0,88

Таблица 8 – Состав мономерных (катехин и эпикатехин) и олигомерных флаван-3-олов (проантоцианидины А-типа) в листьях лавра по Vinha с соавторами [62]

Флаван-3-олы	Извлечения		
	Водное	Спиртоводное (вода-этанол 1:1)	Спиртовое
(+)-Катехин	0,41*	0,58	0,04
(-)-Эпикатехин	0,99	3,44	0,67
Сумма мономеров	1,40	4,02	0,71
Димерные проантоцианидины	1,49	16,97	5,25
Тримерные проантоцианидины 1	0,48	1,24	0,32
Тримерные проантоцианидины 2	1,73	5,05	2,46
Тетрамерные проантоцианидины	1,02	1,16	0,32
Сумма флаван-3-олов	6,12	28,44	9,06

Примечание: * – результаты даны в мг/г в пересчёте на эпикатехин и сухой вес.

Фитохимические исследования настоя листьев лавра, собранных в ноябре 2003 г. в S. Basilio (провинция Кальяри, Сардиния, Италия) были выполнены группой авторов [11] с использованием полупрепаративной ВЭЖХ с диодной матрицей в качестве детектора и tandemной масс-спектрометрией. В водном настое листьев были обнаружены следующие вещества: кемпферол-3-О-глюкопиранозид (**16**); кемпферол-3-О-рамнопиранозид (**17**); кемпферол-3-О-(2",4"-ди-Е-*п*-кумароил)-рамнозид (**18**); кемпферол-3-О-арабинопиранозид (**19**); кемпферол-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозид] (**20**); кверцетин-3-О-глюкопиранозид (**21**); кверцетин-3-О-рамнопиранозид (**22**); кверцетин-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозид] (**23**); 3'-метокси-кверцетин-3-О-[6-О-(рамнопиранозил) глюкопиранозид] (**24**); 3'-метокси-кверцетин-3-О-глюкопиранозид (**25**); катехин (**26**); 2"-рамнозиллизвитексина (**27**); циннамтаннин В1 (**28**) (см. табл. 1).

Содержание производных кемпферола и кверцетина в настое составило 0,31±0,01 мг/100 мл и 2,11±0,01 мг/100 мл, соответственно. Таким образом, в расчете на 200 мл настоя количественное содержание флавоноидов, по данным исследователей, составило приблизительно 5,0 мг.

М. Lu с соавторами [54] обнаружили присутствие флавоноидов и фенольных кислот в этанольных экстрактах лавровых листьев. Содержание фенольных кислот, установленное методом ультраэффективной жидкостной хроматографии составило 474,1±12,7 (мг/г сухого веса), рутина (**29**) – 929,4±19,3 (мкг/г сухого веса) и неидентифицированных флавоноидов – 2138,2±42,7 (мг/г сухого веса). Сумма фенольных соединений (колориметрия по Folin–Ciocalteu) в пересчёте на галловую кислоту и сухое сырьё составила 46,79±3,22 мг/г.

В. Kaurinovic с соавторами исследовали листья культивируемого лавра, собранные в июне 2008 в окрестностях Ulcinj (Черногория) [42]. Сумма флавоноидов в высушенных листьях определялась колориметрическим методом, основанным на свойстве флавоноидов и флавоновых гликозидов образовывать комплексы с ионами алюминия. Поглощение исследуемых растворов измеряли при $\lambda = 430$ нм.

Результаты определений приведены в таблице 2.

Максимальное содержание флавоноидов было обнаружено в этилацетатной фракции, а наименьшее – в водной. Результаты изучения антирадикальной активности этих извлечений в отношении свободных радикалов (DPPH, NO, O₂[•]) представлены в таблице 3. Этилацетатное извлечение показало самое сильное ингибирующее влияние, поскольку значение IC₅₀ было достигнуто при самой низкой концентрации.

Полученные результаты характеризуют выраженное ингибирующее действие флавоноидов из листьев лавра в отношении DPPH радикалов.

Из листьев лавра, купленных в Турции (Orege Forest Agricultural and Food Products Foreign Trade Ltd.) в августе 2007 г. в результате экстракции (CH₂Cl₂, MeOH), последующего фракционирования и разделения с использованием нормально-фазной вакуумной флеш-хроматографии на силикагеле и полупрепаративной ВЭЖХ были выделены аморфные твердые вещества [55]. Метаболиты были идентифицированы как кемпферол-3-О-α-L-(3"-Z, 4"-E-ди-*п*-кумароил)-рамнопиранозид (**30**), кемпферол-3-О-α-L-(3", 4"-ди-Z-*п*-кумароил)-рамнопиранозид (**31**), кемпферол-3-О-α-L-(3", 4"-ди-E-*п*-кумароил)-рамнопиранозид (**32**), кемпферол-3-О-α-L-(2"-E, 4"-Z-ди-*п*-кумароил)-рамнопиранозид (**33**), кемпферол-3-О-α-L-(2", 4"-ди-E-*п*-кумароил)-рамнопиранозид (**34**) и кемпферол-3-О-α-L-(2"-Z, 4"-E-ди-*п*-кумароил)-рамнопиранозид (**35**) (см. табл. 1).

Все соединения исследовались *in vitro* на способность ингибировать натрий-калиевую аденозинтрифосфатазу, выделенную из коры головного мозга свиней.

Сравнение взаимосвязи структуры и активности ацилированных гликозидов кемпферола показывает, что вещество **3(32)**, у которого есть группа E-*п*-кумароила в положении C-3" в рамнопиранозидном кольце, было более активным, чем вещества **1(30)** и **2(31)** с группами Z-*п*-кумароила в C-3" положении. Вещества **5(34)** и **6(35)** имели почти те же самые значения IC₅₀ в отношении Na⁺/K⁺-аденозинтрифосфатазы. Вещество **4(33)** демонстрировало самый мощный ингибирующий потенциал из всех тестируемых веществ. Присутствие E-*п*-кумароила в положении C-2" и Z-*п*-кумароила в положении C-4" в рамнопиранозидном кольце, по мнению авторов, определяло высокую ингибирующую активность исследованных соединений. Как известно, у ингибиторов натрий-калиевой аденозинтрифосфатазы есть значительный терапевтический потенциал в отношении некоторых заболеваний сердца, таких как сердечная недостаточность и сердечные аритмии. Поэтому полученные результаты позволяют продолжить исследование в этом направлении далее. Антибактериальная активность ацилированных гликозидов кемпферола была также изучена в отношении нескольких грамположительных и грамотрицательных бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*. Вещества 1–6 (табл. 4) показали ингибирующую активность в отношении всех исследованных бактерий, за исключением *E. coli*. Вещества **4(33)** и **6(35)** демонстрировали значения минимальной ингибирующей концентрации в диапазоне 0,65–2,08 мкг/мл. Активность исследованных соединений немного уступала действию препарата сравнения ампициллина.

Из полярных фракций метанольного извлечения листьев лавра, собранных в Caserta (Италия) в мае 2011 г., S. Pacifico с соавторами выде-

лили и идентифицировали более 20 фенольных соединений [56]: гексозид 3,4-дигидроксibenзойной кислоты (36); 2',β-дигидрокси-α,β-дигидрохалкон-α-О-гексозид (37); 1-(2'-гидроксифенил)-1-гидроксифенилпропан-α-О-гексозид (38); гексозид кумаровой кислоты (39); 2'-гидрокси-α,β-дигидрохалкон-α-О-гексозид (40); апигенин-6,8-ди-С-гексозид (41); апигенин-6-С-(2"-О-деоксигексозил)-гексозид (42); 8-С-гексозил апигенина (43); кверцетин-3-О-(6"-О-деоксигексозил)-гексозид (44); тетра-метокси-дигидрокверцетин-3-О-пентозид (45); кемпферол-3-О-(6"-О-деоксигексозил)-гексозид (46); кверцетин-3-О-гексозид (изомеры 1 и 2) (47); изорамнетин-3-О-(6"-О-деоксигексозил)-гексозид (48); кверцетин-3-О-пентозид (49); циннамтанин В1 (28); кемпферол-3-О-гексозид (50); кверцетин-3-О-деоксигексозид (51); изорамнетин-3-О-гексозид (52); кемпферол-3-О-пентозид (53); кемпферол-3-О-деоксигексозид (54) (см. табл. 1).

Фракции, из которых были выделены данные соединения, показали высокую антиоксидантную активность. Авторы исследования заключают, что богатые фенольными соединениями извлечения из листьев лавра благородного представляют интерес с точки зрения поиска эффективных растительных средств в предотвращении и лечении болезни Альцгеймера и других возрастных дегенеративных заболеваний.

Исследование М. Dias с коллегами ставило своей целью сравнительное изучение образцов культивируемых и дикорастущих листьев лавра по пищевой ценности, некоторых групп природных соединений, в том числе фенольных [57]. Для этого образец сырья (воздушно-сухие листья) от культивируемых растений был куплен в компании Ervital в Каштру-Дайри (Castro Daire) в Португалии. Согласно данным производителя листья были собраны в 2012 г. Дикорастущее сырьё (свежие листья) заготовлено осенью того же года в Браганса (Bragança), Португалия и в последующем высушено. Оба образца лиофилизировали, чтобы сохранить, насколько возможно, их нативный химический состав до анализа. Фенольные соединения определялись методом ВЭЖХ и идентифицировались по их УФ- и масс-спектрам, временам удерживания и сравнением со стандартными образцами. Фенольный профиль исследованных образцов характеризовался присутствием флаван-3-олов, флавонолов и флавонов. В составе соединений из этих групп были обнаружены: гексозид эпикатехина (55), (+)-галлокатехин (56), тетрамер процианидина, (+)-катехин (57), димер процианидина, (-)-эпикатехин (58), тетрамер процианидина (А- и В-типа связей), тример процианидина, лютеолина 6-С-глюкозид (59), апигенина 8-С-глюкозид (60), 2"-О-рамнозил-С-гексозил-апигенин, кверцетина 3-О-рутинозид (29), апигенина 6-С-глюкозид (61), кверцетина 3-О-глюкозид (62), кверцетина О-гексозид, кемпферола 3-О-рутинозид

(63), кверцетина О-пентозид, кемпферола 3-О-глюкозид (64) (см. табл. 1), изорамнетин О-рутинозид, кверцетина О-рамнозид, изорамнетина О-гексозид, кемпферола О-пентозид, изорамнетина О-пентозид, кемпферола О-гексозид, изорамнетина О-рамнозид.

Культивируемое сырьё содержало фенольные вещества в более высокой концентрации, особенно производные флавонов и флавонолов. Однако содержание флаван-3-олов было сходно в обоих образцах. Именно эта группа фенольных соединений была преобладающей в культивируемом и дикорастущем лавре. Метанольное извлечение и настой, полученные из образца листьев от культивируемых растений, кроме того, показали более высокую антиоксидантную активность.

Продолженные позднее этими авторами исследования [58] выявили активность (*in vitro*) фенольных извлечений в отношении линий опухолевых клеток человека, а также клеток бактерий и грибов. Установлено, что извлечения из образцов дикорастущих листьев лавра сильнее ингибировали линии опухолевых клеток (HeLa, MCF7, NCI-H460 и HCT15). Метанольные извлечения имели более высокую антибактериальную активность. Различия в биологической активности, по мнению авторов, могли быть связаны с различным содержанием фенольных соединений.

Согласно результатам, представленным в таблице 5, культивируемые образцы показали более высокие концентрации флавоноидов и флавонов. С другой стороны, метанольные извлечения отличались высоким содержанием флаван-3-олов.

Высушенные листья лавра, приобретённые на рынке в Сальтильо, Coahuila, Мексика, в ноябре 2010 г. были исследованы на содержание фенольных соединений и влияние нескольких экспериментальных факторов на процессы их экстракции из сырья. Среди исследованных факторов особое внимание было уделено соотношению твёрдое тело : жидкость и концентрации растворителя [59]. Лучшие результаты были получены при ультразвуковой экстракции 1 г растительного образца с 12 мл 35%-ного этанола в течение 40 минут. Выход фенольных веществ составил 17,32±1,52 мг/г. ВЭЖХ-анализ обнаружил присутствие в извлечениях двух фенольных кислот – кумаровой (65) и 2-гидроксициннамовой (66).

Изучение химического состава двух образцов листьев и побегов лавра благородного, собранных в ноябре 2013 г. в Крыму в окрестностях г. Алушта (1) и пос. Рыбачье (2) показало, что они содержат углеводы, жирные кислоты, аминокислоты и фенольные вещества [60]. Авторами исследования определено содержание основных групп БАВ, в том числе фенольных соединений, в разных образцах побегов и листьев лавра благородного (таблица 6).

Как следует из данных таблицы 6, содержание окисляемых фенолов, гидроксикоричных кислот и флавоноидов в образцах листьев различалось незна-

чительно. При этом содержание суммы окисляемых фенолов составило не менее 4,5%, суммы гидрокси-коричных кислот – не менее 1,3%, суммы флавоноидов – не менее 0,8%. Полученные авторами данные показывают, что содержание исследованных групп фенольных соединений немного выше в образцах листьев лавра в сравнении с побегами. Образец листьев и побегов лавра №1 показал самое высокое содержание фенольных соединений.

Сырье лавра благородного (листья и плоды), заготовленное в Крыму в 2013 году, изучали методом ВЭЖХ-УФ [61]. В листьях лавра обнаружены 3 соединения флавановой природы, доминирующим компонентом оказался эпикатехин (67), содержание которого составило 1,29%. Кроме того, обнаружены катехин (1,06%) и эпигаллокатехин (68) (0,40%). В плодах также было обнаружено 3 соединения флавановой природы, при этом доминирующими компонентами были эпикатехин (0,65%) и эпигаллокатехин (0,51%). Химическим различием исследованных образцов сырья являлось наличие в листьях катехина, а в плодах – галловой кислоты (0,02%) и эпикатехингаллата (69) (0,16%).

Фенольный профиль и антиокислительная активность листьев лавра, собранных на севере Португалии, Азорских островах и Мадейре (Португалия) были проанализированы А. Vinha с соавторами [62]. Высушенные листья использовались для получения водного, спиртового и спиртоводного (вода-этанол 1:1) извлечений. Фенольный профиль экстрактов определялся с помощью ВЭЖХ с детектором на диодной матрице, совмещённой с масс-спектрометром. Результаты исследования представлены в таблицах 7 и 8.

Наибольшая антиоксидантная активность в исследовании с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом

была выявлена у спиртового извлечения, а наименьшая – у водного.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные в обзоре данные характеризуют листья, плоды и побеги лавра благородного как ценные сырьевые источники фенольных соединений, таких как фенольные кислоты, флавоноиды, проантоцианидины и т.д. В сумме их содержание в листьях может достигать до 99,7 г/кг (в пересчёте на галловую кислоту). Антоцианы в плодах лавра накапливаются в количестве до 217 мг в пересчёте на цианидин 3-глюкозид /г очищенного от косточек сырья. Количественное содержание этих групп веществ варьирует в зависимости от места сбора, источника сырья (культивируемые или дикорастущие растения), времени (фазы) его заготовки, способа сушки и извлечения из сырья и т.д. Фенольные соединения лавра по результатам проведённых исследований проявляют выраженную антиоксидантную и антирадикальную активность, оказывают ингибирующее влияние на продукцию NO, натрий-калиевую аденозинтрифосфатазу, на линии опухолевых клеток (HeLa, MCF7, NCI-H460 и HCT15), характеризуются антибактериальным действием в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Дальнейшее более глубокое исследование лавра благородного культивируемого в России актуально, позволит оценить качество его сырья по содержанию фенольных соединений и разработать методики его стандартизации по этой группе действующих веществ. Кроме того, разработка нормативной документации на сырьё лавра благородного позволит существенно расширить внедрение в медицинскую практику новых лекарственных средств на его основе.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Marzouki, H., Piras, A., Salah, K. B. H., Medini, H., Pivetta, T., Bouzid, S., Falconieri, D. Essential oil composition and variability of *Laurus nobilis* L. growing in Tunisia, comparison and chemometric investigation of different plant organs // Natural product research. 2009. Vol. 23. Is. 4. P. 343–354.
- Barla, A., Topcu, G., Oksuz, S., Tumen, G., Kingston, D.G.I. Identification of cytotoxic sesquiterpenes from *Laurus nobilis* L. // Food Chemistry. 2007. Vol. 104, Is. 4. P. 1478–1484.
- Fang, F., Sang, S., Chen, K.Y., Gossiau, A., Ho, C.-T., Rosen, R.T. Isolation and identification of cytotoxic compounds from Bay leaf (*Laurus nobilis*) // Food Chemistry. 2005. Vol. 93, Is. 3. P. 497–501.
- Ivanoic, J., Misin, D., Ristic, M., Pesic, O., Zizovic, I. Supercritical CO2 extract and essential oil of bay (*Laurus nobilis* L.) – chemical composition and antibacterial activity // Journal of the Serbian Chemical Society. 2010. Vol. 75. P. 395–404.
- Ouchikh, O., Chahed, T., Ksouri, R., Taarit, M.B., Faleh, H., Abdely, C., Kchouk, M.E., Marzouk, B. The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of *L. nobilis* vegetative organs // Journal of Food Composition and Analysis. 2011. Vol. 24. P. 103–110.
- Conforti, F., Statti, G., Uzunov, D., Menichinia, F. Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. Leaves

- and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) Coutinho Seeds // *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2006. Vol. 29. P. 2056–2064.
7. Ozcan, B., Esen, M., Sangun, M.K., Coleri, A., Caliskan, M. Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil // *Journal of Environmental Biology*. 2010. Vol. 31. P. 637–641.
 8. Polovka, M., Suhaj, M. Detection of caraway and bay leaves irradiation based on their extracts antioxidant properties evaluation // *Food Chemistry*. 2010. Vol. 119. P. 391–401.
 9. Speroni, E., Cervellati, R., Dall'Acqua, S., Guerra, M.C., Greco, E., Govoni, P., Innocenti, G. Gastroprotective effect and antioxidant properties of different *Laurus nobilis* L. leaf extracts // *Journal of Medicinal Food*. 2011. Vol. 14. P. 499–504.
 10. Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Matos, O., Serrano, C., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Nunes, M.L., Marques, M. Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay leave *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. *Natural Product Research*. 2012. Vol. 6. P. 518–529.
 11. Dall'Acqua, S., Cervellati, R., Speroni, E., Costa, S., Guerra, M.C., Stella, L., Greco, E., Innocenti, G. Phytochemical composition and antioxidant activity of *Laurus nobilis* L. leaf infusion // *Journal of Medicinal Food*. 2009. Vol. 12. P. 869–876.
 12. Ghannadi A. *Lauri Folium*. In: "Iranian Herbal Pharmacopoeia". Tehran: Publications of Iranian Ministry of Health (2002).
 13. Ramling P., Meera M., Priyanka P. Phytochemical and Pharmacological Review on *Laurus Nobilis* // *Int. J. of Pharm. and Chem. Sci.* 2012. Vol. 1, Is. 2. P. 595–602.
 14. Esra K., Ilkay O., Erdem Y. Evaluation of Some Plants Used in Turkish Folk Medicine for Their Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities // *Pharmac. Biol.* 2007. Vol. 45, Is. 7. P. 547–555.
 15. Bilen S., Bulut M. Effect of Laurel (*Laurus nobilis*) on the non-Specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) // *J. of Animal and Veterinary Advances*. 2010. Vol. 9, Is. 8. P. 1275–1277.
 16. Shin J., Oh K., Lee S., Nam K., Koo U., Kim K.H., Mar W. Neuroprotective Effect of the n-Hexane Extracts of *Laurus nobilis* L. in Models of Parkinson's Disease // *Biomol. Ther.* 2011. Vol. 19, Is. 1. P. 118–125.
 17. Rizi M.V. Chemical Composition and Larvicidal Activity of the Essential Oil of *Laurus nobilis* L. from Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* // *Iranian J. of Pharmac. Sci.* 2009. Vol. 5, Is. 1. P. 47–50.
 18. Saab A.M., Tundis R., Loizzo M.R., Lampronti I., Borgatti M., Gambari R., Menichini F., Esseily F., Menichini F. Antioxidant and antiproliferative activity of *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) leaves and seeds essential oils against K562 human chronic myelogenous leukaemia cells // *Natural Product Research*. 2012. Vol. 26. P. 1741–1745.
 19. Kaileh, M., W. V. Berghe, E. Boone, T. Essawi, G. Haegeman. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity // *Journal of Ethnopharmacology*. 2007. Vol. 113, Is. 3. P. 510–516.
 20. Al-Kalaldeh, J.Z., Abu-Dahab, R. Afifi F.U. Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum*, *Origanum vulgare*, and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells // *Nutrition Research*. 2010. Vol. 30, Is. 4. P. 271–278.
 21. de Corato, U., O. Maccioni, M. Trupo, G. Di Sanzo. Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi // *Crop Protection*. 2010. Vol. 29, Is. 2. P. 142–147.
 22. Millezi, A. F., D. S. Caixeta, D. F. Rossoni, M. G. Cardoso, and R. G. Piccoli. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens // *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 2012. Vol. 32. P. 167–172.
 23. Adwan, G., Mhanna M. Synergistic effects of plant extracts and antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens // *Middle-East Journal of Scientific Research*. 2008. Vol. 3. P. 134–139.
 24. Al-Hussaini, R., Mahasneh A.M. Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts // *Molecules*. 2009. Vol. 14, Is. 9. P. 3425–3435.
 25. Fukuyama N., Ino C., Suzuki Y., Kobayashi N., Hamamoto H., Sekimizu K., Orihara Y. Antimicrobial sesquiterpenoids from *Laurus nobilis* L. // *Natural Product Research*. 2011. Vol. 25, Is. 14. P. 1295–1303.
 26. Otsuka, N., M.-H. Liu, S. Shiota et al. Anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds isolated from *Laurus nobilis* // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2008. Vol. 31, Is. 9. P. 1794–1797.
 27. Liu, M.-H., N. Otsuka, K. Noyori et al. Synergistic effect of kaempferol glycosides purified from *Laurus nobilis* and fluoroquinolones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2009. Vol. 32, Is. 3. P. 489–492.
 28. Огай М.А., Степанова Э.Ф. Разработка и исследование гипогликемического фитосбора // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2006. № 2. С. 332–333.
 29. Огай М.А., Степанова Э.Ф., Ларионов Л.П., Петров А.Ю. Фармакологические исследования и технология фитогелей для коррекции последствий сахарного диабета // *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2009. № 2. С. 171–173.
 30. Пат. 2071783 Россия, МКИ 6 А 61 К 35/78. Способ получения средства для лечения сахарного диабета / Бабакин А.Ф., Найданова Л.Ф., Мазуров В.И., Руженков Д.В., Кириченко Н.Н. № 93044820/14; Заявл. 07.09.93; Опубл. 20.01.97, Бюл. № 2.
 31. Патент на изобретение. Смирнов В.М. Биологически активная пищевая добавка и способ повышения умственной и физической работоспособности человека // Номер патента: 2176895. Страна: Россия. Год: 2001. Дата регистрации: 22.11.1999. Номер заявки: 99124708/13. МПК: 7А 23Л 1/30 А, 7А 61К 35/78 В.
 32. Diáz-Maroto, M.; Rez-Coello, M.; Cabezudo, M. Effect of drying method on the volatiles in bay leaf (*Laurus nobilis* L.) // *J. Agric. Food Chem.* 2002. Vol. 50. P. 4520–4524.
 33. Насухова, Н.М., Коновалов Д.А. Динамика накопления эфирного масла в листьях лавра благородного // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2014. № 5. С. 94–95.
 34. Насухова, Н.М., Коновалов Д.А. Сесквитерпеновые лактоны листьев и плодов *Laurus nobilis* L. (лавра благородного) // *Фармация и фармакология*. 2014. № 2 (3). С. 23–33.
 35. El-Feraly, S.; Benigni, D. Sesquiterpene lactones of *Laurus nobilis* leaves // *J. Nat. Prod.* 1980. Vol. 43. P. 527–531.
 36. Matsuda, H.; Kagerura, T.; Toguchida, I.; Ueda, H.; Morikawa, T.; Yoshikawa, M. Inhibitory Effects of sesquiterpene from Bay leaf on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: structure requirement and role of heat shock protein induction // *Life Sci.* 2000. Vol. 66. P. 2151–2157.
 37. Сенченко С.П., Насухова Н.М., Агова Л.А., Коновалов Д.А. Использование ВЭЖХ и капиллярного электрофореза для количественного определения костунолида и дегидрокостуслактона в листьях лавра благородного // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2014. № 4 (52). С. 18–20.
 38. Yoshikawa, M.; Shimoda, H.; Uemura, T.; Morikawa, T.; Kawahara, Y.; Matsuda, H. Alcohol absorption inhibitors from Bay leaf (*Laurus nobilis*): Structure-requirements

- of sesquiterpenes for the activity // *Bioorg. Med. Chem.* 2000. Vol. 8. P. 2071–2077.
39. Rasul, A., Parveen, S., & Ma, T. (2012). Costunolide: A novel anti-cancer sesquiterpene lactone // *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 7(1), 6–13.
 40. Lin, X., Peng, Z., & Su, C. (2015). Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostuslactone. *International journal of molecular sciences*, 16(5), 10888–10906.
 41. Emam, A.M., Mohamed, M.A., Diab, Y.M., Megally, N.Y. Isolation and structure elucidation of antioxidant compounds from leaves of *Laurus nobilis* and *Emex spinosus* // *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2010. Vol. 4. P. 202–207.
 42. Kaurinovic, B., Popovic, M., Vlaisavljevic, S. In vitro and in vivo effects of *Laurus nobilis* L. leaf extracts // *Molecules*. 2010. Vol. 15. P. 3378–3390.
 43. Нестерова, О. В., Доброхотов, Д. А., & Дидманидзе, И. О. (2015). Анализ фитохимических свойств и некоторых показателей качества листьев лавра благородного // *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*, (1), 23–30.
 44. Kang, Yu K.W., Jun W.J., Chang I.S., Han S.B., Kim H.Y., Cho H.Y. Isolation and characterization of alkyl peroxy radical scavenging compound from leaves of *Laurus nobilis* // *Biol. Pharm. Bull.* 2002. Vol. 25, Is.1. P. 102–108.
 45. de Marino S., Borbone N., Zollo F., Ianaro A., Di Meglio P., Iorizzi M. Megastigmane and Phenolic Components from *Laurus nobilis* L. Leaves and Their Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production // *J. Agric. Food Chem.* 2004. Vol. 52. P. 7525–7531.
 46. Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., & Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities // *Food chemistry*, 89(2), 191–198.
 47. Longo, L., & Vasapollo, G. (2005). Anthocyanins from bay (*Laurus nobilis* L.) berries // *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 8063–8067.
 48. Papageorgiou V., Mallouchos A., Komaitis M. Investigation of the Antioxidant Behavior of Air- and Freeze-Dried Aromatic Plant Materials in Relation to Their Phenolic Content and Vegetative Cycle // *J. Agric. Food Chem.* 2008. Vol. 56. P. 5743–5752.
 49. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
 50. Cannac, M.; Ferrat, L.; Barboni, T.; Pergent, G.; Pasqualini, V. The influence of tissue handling on the flavonoid content of the aquatic plant *Posidonia oceanica* // *J. Chem. Ecol.* 2007. Vol. 33. P. 1083–1088.
 51. Moure, A.; Cruz, J. M.; Franco, D.; Dominguez, J. M.; Sineiro, J.; Dominguez, H.; Jose Nunez, M.; Parajo, J. C. Natural antioxidants from residuals sources // *Food Chem.* 2001. Vol. 72. P. 145–171.
 52. Muchuweti, M., Kativu, E., Mupure, C. H., Chidewe, C., Ndhala, A. R., Benhura, M. A. N. Phenolic composition and antioxidant properties of some spices // *American Journal of Food Technology*. 2007. Vol. 2, Is. 5. P. 414–420.
 53. Ünver, A., Arslan, D., Özcan, M.M., Akbulut, M. Phenolic content and antioxidant activity of some spices // *World Applied Sciences Journal*. 2009. Vol. 6, Is. 3. P. 373–377.
 54. Lu, M., Yuan, B., Zeng, M., Chen, J. Antioxidant capacity and major phenolic compounds of spices commonly consumed in China // *Food Research International*. – 2011. Vol. 44, Is. 2. P. 530–536.
 55. Lee, S., Chung, S.-Ch., Lee, S.-H., Park, W., Oh, I., Mar, W., Shin, J., Oh, K.-B. Acylated kaempferol glycosides from *Laurus nobilis* leaves and their inhibitory effects on Na⁺/K⁺-adenosine triphosphatase // *Biol. Pharm. Bull.* 2012. Vol. 35, Is. 3. P. 428–432.
 56. Pacifico, S., Gallicchio, M., Lorenz, P., Duckstein, S.M., Potenza, N., Galasso, S., Marciano, S., Fiorentino, A., Stintzing, F.C., Monaco, P. Neuroprotective Potential of *Laurus nobilis* Antioxidant Polyphenol-Enriched Leaf Extracts // *Chemical research in toxicology*. 2014. Vol. 27, Is. 4. P. 611–626.
 57. Dias, M.I., Barros, L., Duenas, M., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C. Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: would be more suitable a wild or a cultivated sample? // *Food chemistry*. 2014. Vol. 156. C. 339–346.
 58. Dias, M.I., Barreira, J., Calhella, R.C., Queiroz, M.J.R., Oliveira, M. B. P. P., Soković, M., Ferreira, I.C. Two-dimensional PCA highlights the differentiated antitumor and antimicrobial activity of methanolic and aqueous extracts of *Laurus nobilis* L. from different origins // *BioMed research international*. 2014. Vol. 2014. 10 p.
 59. Muñoz-Márquez, D.B., Martínez-Ávila, G.C., Wong-Paz, J.E., Belmares-Cerda, R., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity // *Ultrasonics sonochemistry*. 2013. Vol. 20, Is. 5. P. 1149–1154.
 60. Musienko, S.G., Kyslychenko, V.S. The quantitative content of the main groups of biologically active substances in the bay laurel raw material // *Вісник Фармації*. 2014. №4(80). С. 22–24.
 61. Мусієнко, С.Г., Кисличенко, В.С. Дослідження фенольних сполук сировини лавра благородного // *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. ПЛ Шупика*. 2014. №. 23 (4). С. 341–344.
 62. Vinha, A. F., Guido, L. F., Costa, A. S., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. (2015). Monomeric and oligomeric flavan-3-ols and antioxidant activity of leaves from different *Laurus* sp. *Food & function*, 6(6), 1944–1949.

АВТОРЫ

Коновалов Дмитрий Алексеевич – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0960-6127. Research-

er ID: B-7017-2017. Scopus Author ID: 56436041900. E-mail: d.a.konovalov@pmedpharm.ru

Алиева Наида Махмудовна – старший преподаватель кафедры нормальной физиологии, Дагестанский государственный медицинский университет Минздрава России, e-mail: nasuhov.5@mail.ru

УДК: 615.355



КОЛЛАГЕНАЗЫ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ: СОВРЕМЕННЫЕ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНАЗЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ

А.В. Майорова¹, Б.Б. Сысеев², Ю.О. Иванкова³, И.А. Ханалиева¹¹ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2³ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357532, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

E-mail: bsb500@yandex.ru

Получено 12.08.2019

Рецензия (1) 12.09.2019

Рецензия (2) 10.10.2019

Принята к печати 15.10.2019

Цель. Оценка состояния изученности применения коллагенолитических ферментов (коллагеназ) в терапии ран и рубцов, источников их получения, ассортимента средств с коллагеназой для выявления направлений их совершенствования.

Материалы и методы. В работе использованы информационно-поисковые и библиотечные базы данных (eLIBRARY, PubMed, Scopus, ScholarGoogle, ResearchGate), патентно-информационные базы (freepatent.ru, ntpo.com, fips.ru), Государственный реестр лекарственных средств и Государственный реестр медицинских изделий, а также техническая информация, представленная производителями лекарственных средств и медицинских изделий.

Результаты. Анализ информационных источников показал, что коллагенолитические ферменты являются эффективными протеолитическими комплексами, т.к. обладают способностью обеспечивать расщепление коллагена, являющегося главным компонентом ран и рубцов. Одним из доступных сырьевых источников коллагеназ в России в настоящее время является гепатопанкреас ракообразных. Отмечается, что для протеолитических ферментов из гепатопанкреаса камчатского краба характерна широкая специфичность: они способны гидролизовать как нативный коллаген, так и другие белковые субстраты. Имеются данные исследований, подтверждающие, что коллагеназы наряду с очисткой раны от некроза способны ускорять процесс ее репарации. Результаты клинических исследований противорубцовых свойств коллагеназ свидетельствуют об эффективности их использования для коррекции рубцовых изменений кожи. Контент-анализ показал, что на российском фармацевтическом рынке присутствует незначительное количество средств на основе коллагеназ – лиофилизированный порошок для приготовления раствора для инъекций («Коллализин»), рекомендуемый для лечения рубцов; медицинская повязка с коллагеназой, рекомендуемые для лечения ран и некротических поражений «Дигестол»; гель и порошок «Ферменкол», гель «Карипаин плюс» для лечения рубцов. Лекарственные препараты представлены только порошком-лиофилизатом «Коллализин».

Заключение. Разработка состава гелей (олеогелей на основе аэросила) и атравматических салфеток с коллагеназой из гепатопанкреаса краба как наиболее доступного сырья можно считать актуальной задачей практической фармакологии. Это предусматривает создание лекарственных форм, улучшенных с позиций стабильности и эффективности, а также удобства использования.

Ключевые слова: коллагенолитические ферменты, коллагеназа камчатского краба, рубцы, раны, препараты, гели

Для цитирования: А.В. Майорова, Б.Б. Сысеев, Ю.О. Иванкова, И.А. Ханалиева. Коллагеназы в медицинской практике: современные средства на основе коллагеназы и перспективы их совершенствования. *Фармация и фармакология*. 2019;7(5):260-270. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-260-270

© А.В. Майорова, Б.Б. Сысеев, Ю.О. Иванкова, И.А. Ханалиева, 2019

For citation: A.V. Mayorova, B.B. Sysuev, J.O. Ivankova, I.A. Hanaliev. Collagenases in medical practice: modern collagenase-based preparations and prospects for their improvement. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(5): 260-270. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-260-270

COLLAGENASES IN MEDICAL PRACTICE: MODERN COLLAGENASE-BASED PREPARATIONS AND PROSPECTS FOR THEIR IMPROVEMENT

A.V. Mayorova¹, B.B. Sysuev², J.O. Ivankova³, I.A. Hanalieva¹

¹ Russian University of Friendship of Peoples. 6, Miklukho-Maklay Str., Moscow, Russia 117198.

² First Moscow State Medical University n.a. I. M. Sechenov (Sechenov University).

6, Trubetskaya Str., Moscow, Russia 119991

³ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University.

11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia 357532

E-mail: bsb500@yandex.ru

Received 12 August 2019

Review (1) 12 September 2019

Review (2) 10 October 2019

Accepted: 15 October 2019

The aim of this study was to assess the coverage of studies of collagenolytic enzymes (collagenases) in the sphere of their use in wounds and scars treatment, the resource of their production and the range of collagenase products to identify the areas for their improvement.

Materials and methods. The information from retrieval and library databases (eLIBRARY, PubMed, Scopus, ScholarGoogle, ResearchGate), patent information databases (freepatent.ru, ntpo.com, fips.ru), the State register of medicines (GRLS) and the State register of medical devices, as well as technical information provided by manufacturers of medicines and medical devices, was used in the article.

Results. The analysis of the information database has shown that collagenolytic enzymes are effective proteolytic complexes because of their ability to provide the breakdown of collagen, the main component of wounds and scars.

Hepatopancreas crustaceans is currently one of the available raw resources of collagenases in Russia. It is noted that proteolytic enzymes from the *Paralithodes camtschatica* hepatopancreas are characterized by a broad specificity: they are able to hydrolyze both native collagen and other protein substrates. There are data confirming the capability of collagenases to accelerate the process of reparation in addition to wound cleansing from a necrosis. The results of clinical studies of collagenases anti-scar properties, indicate the effectiveness of their use for the skin scar correction. The content analysis has shown that there is a small amount of collagenase-based products in the Russian pharmaceutical market: lyophilized powder for preparation of the injection solution "Collalysin", recommended for scars treatment; a medical dressing "Digestol" with collagenase, recommended for wounds and necrotic lesions treatment; "Fermencol" (gel and powder), the "Karpain plus" gel for scars treatment. Drugs are represented by only powder lyophilisate "Collalysin".

Conclusion. The development of gel compositions (Aerosil-based oleogels) and atraumatic dressings with collagenase from *Paralithodes camtschatica* hepatopancreas as the most affordable raw materials can be considered problem number one of practical pharmacy at present. This provides for the creation of the dosage forms, improved in terms of stability and efficiency, as well as ease of use.

Keywords: collagenolytic enzymes, *Paralithodes camtschatica* collagenase, scars, wounds, preparations, gels

ВВЕДЕНИЕ

Проблема эффективного и быстрого заживления ран, образующихся в результате травм различного происхождения, остается одной из актуальных в современной медицинской практике. В настоящее время эффективность ранозаживления определяется не только сроком, но и достигаемым эстетическим результатом. Кроме того, особое внимание уделяется комфортности лечения для совмещения оптимального терапевтического эффекта и качества жизни пациента [1].

Для ускорения процесса грануляции и сокращения сроков ранозаживления в медицинской практике применяются препараты протеолитических ферментов, в основе действия которых лежит способность очищать раны от некротизированных тка-

ней и экссудата. Препараты протеолитических ферментов (коллагеназы, гиалуронидаза) используются и для медикаментозной коррекции рубцов [2, 3].

Применение ферментных препаратов в составе средств наружной терапии имеет особенности, обусловленные главным образом их неустойчивостью, что делает актуальным совершенствование существующих лекарственных форм как в отношении стабильности и эффективности, так и удобства применения. Коллагеназы являются одними из самых эффективных протеолитических ферментов, т.к. обладают способностью обеспечивать расщепление коллагена – главного компонента ран и рубцов. Таким образом, изучение вопросов, касающихся сырьевых источников коллагенолитических ферментов, механизмов действия, клинической эффективности

применения коллагеназ при ранах и рубцах, а также ассортимента и особенностей использования средств на основе коллагеназ в медицинской практике, являются актуальными.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – оценка состояния изученности применения коллагенолитических ферментов (коллагеназ) в терапии ран и рубцов, источников их получения, ассортимента средств с коллагеназой для выявления направлений их совершенствования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы информационно-поисковые и библиотечные базы данных (eLIBRARY, PubMed, Scopus, ScholarGoogle, ResearchGate за временной интервал с 2000 по 2019 гг.), патентно-информационные базы (freepatent.ru, ntpo.com, fips.ru), справочная литература, Государственный реестр лекарственных средств и Государственный реестр медицинских изделий, а также техническая информация, представленная производителями лекарственных средств и медицинских изделий, сайты, посвященные косметической продукции «Ферменкол» и «Карипаин». Глубина патентного поиска составила 30 лет. Ключевые слова в процессе поиска: коллагеназа, коллагенолитические ферменты, иммобилизация ферментов, раны, лечение, рубцы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Роль препаратов ферментов

в коррекции патологического ранозаживления

Заживление ран представляет собой сложный биологический процесс, который состоит из перекрывающихся фаз: воспаления, пролиферации и ремоделирования. Ранозаживление – это регулируемый процесс, в котором принимают несколько типов клеток (кератиноциты, фибробласты, эндотелиальные клетки, макрофаги и тромбоциты) и сеть сигнальных молекул (цитокины, хемокины и факторы роста). В его ходе возможны нарушения, которые могут привести к появлению осложнений – незаживающих хронических ран или рубцов. Наиболее распространенными факторами, препятствующими нормальному заживлению, являются сахарный диабет, заболевания вен, пожилой возраст, периферическая невропатия, нарушение состава микрофлоры и недостаточное питание. Хронической считается рана, не проявляющая тенденцию к заживлению в течение более 4 недель. Так, по некоторым данным, после 20 недель лечения полное закрытие раны достигается всего в 25–50% случаев хронических или трудно заживающих ран, особенно в случае венозных и диабетических язв. Хронические трудно заживающие раны часто характеризуются рядом микробиологических (повышенная микробная обсемененность, в том числе наличие биопленок), биохимических и клеточных патологий, которые препятствуют заживлению или замедляют его. В отличие от острых ран, хронические

раны не завершаются процессом ремоделирования, а рассматриваются как процесс, остановившийся на стадии воспаления или пролиферации [1–4].

Наличие клеточного детрита, некротических тканей и бактериальных токсинов ведет к пролонгации воспаления и повышенной выработке цитокинов макрофагами и нейтрофилами, результатом чего является активация макрофагов и фибробластов. Наблюдается избыточная активность тканевых протеаз [3].

Для лечения хронических ран применяется так называемая технология обработки дна (ложа) для удаления некротического компонента и перехода хронической раны в острую. Традиционно для удаления некротических, поврежденных или инфицированных тканей используются различные способы: хирургический, аутолитический, ферментативный, химический и физические методы. Очищение ран способствует уменьшению присутствия воспалительных цитокинов и металлопротеиназ, которые вырабатываются в при хроническом воспалении в ранах [4].

Одной из проблем патологического ранозаживления является образование рубцов (келоидных и гипертрофических), возникающее при нарушении регуляции баланса процесса синтеза-распада коллагена фибробластами и кератиноцитами нарушение процесса ремоделирования коллагена. Стимулирующее влияние на фибробласты оказывает хроническое воспаление тканей рубца и длительное заживление раны, вторичное инфицирование, нарушение эпителизации [1].

Ферментативная очистка ран является эффективным и селективным методом, часто используемым в сочетании с другими методами лечения, например, в сочетании с увлажняющими повязками. В хронических ранах она необходима не только для очистки – удаления некротической ткани, но и для миграции клеток, участвующих в эпителизации, а также устранения воспаления. В отличие от препаратов кислот, используемых для лечения ран с большим содержанием некротических тканей, например, мази, содержащей салициловую кислоту 40%, протеазы не оказывают действия на неповрежденные ткани [2, 3].

Коллаген является наиболее прочным белком тканевого детрита. При этом раны, содержащие коллагеновые волокна, плохо поддаются энзиматическому очищению с помощью других протеолитических ферментов – трипсина, химопсина, папаина, террилитина, стрептокиназы и др. [2]. Препараты коллагеназ успешно используются для лечения ран с массивным гнойно-некротическим отделяемым, трофических язв, обморожений, ожогов, рубцов. Для лечения ран и устранения рубцовых изменений кожи наиболее эффективны протеолитические ферменты, обладающие коллагенолитической активностью [5–11].

Характеристика коллагеназ, используемых в медицинской практике: источники получения, механизм действия, данные фармакологических и клинических исследований

Коллагеназа – это специфический протеолитический фермент, разрушающий пептидные связи в природном коллагене, основном структурном элементе соединительной ткани. По источнику получения активного ингредиента препараты коллагеназ относятся к биологическим средствам, т.к. промышленным сырьем являются культуры микроорганизмов или пищеварительные железы животных. Анализ состава коммерческих лекарственных препаратов, ветеринарных средств, медицинских изделий и косметических средств, содержащих коллагеназы, показал, что современные средства содержат в своем составе ферментные комплексы, источником которых являются бактерии семейства *Clostridium* или органы пищеварительного тракта (гепатопанкреас) камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* [12–15].

Коллагеназы, полученные из *Clostridium histolyticum*, наиболее часто используемые для получения лекарственных средств микробные протеазы, представляют собой одноцепочечные белки с массами от 68 кДа до 130 кДа. Так, лекарственный препарат «Сантил» мазь, содержит две коллагеназы (коллагеназу G, ~114 кДа и коллагеназу H, ~110 кДа), неспецифическую нейтральную металлопротеиназу (~35 кДа), незначительное количество цистеиновых протеаз (кlostрипаин ~58 кДа). К недостаткам препаратов микробных коллагеназ относят сравнительно невысокую активность, трудности культивирования продуцентов, а также потенциальную аллергенность, причиной которой может стать использование патогенных микроорганизмов-продуцентов [4, 11, 12].

В РФ довольно широко используется в качестве источника коллагеназ гепатопанкреас ракообразных, который рассматривается как доступное, дешевое и нетоксичное сырье, т.к. является отходом переработки промыслового камчатского краба. Исследованию этой группы протеаз посвящены работы как в направлении получения стабильных и высоко активных ферментных комплексов, так и разработки эффективных препаратов [13–19].

Гепатопанкреас ракообразных вырабатывает целый ряд пищеварительных ферментов, гидролизующих различные классы биополимеров: коллагенолитические (сериновые, трипсиноподобные) протеазы, коллагеназы, фосфотазы, фосфодиэстеразы, эластазы, РНКазы, ДНКазы и др. Доказано, что протеолитическим ферментам гепатопанкреаса камчатского краба свойственна широкая специфичность. Они расщепляют как нативный коллаген, так и другие белковые субстраты – казеин, желатин, фибриноген и сывороточный альбумин, что обуславливает во многом высокую эффективность данных комплексов [14, 16, 20].

Ферментные комплексы, полученные из гепатопанкреаса краба, различаются по степени чистоты, активности и составу. Так, была выделена сумма коллагенолитических протеаз гепатопанкреаса краба, являющаяся смесью девяти белков с молекулярной массой 23–36 кДа. В препаратах «Коллалитин» и «Коллагеназа КК» коллагенолитические протеазы гепатопанкреаса краба содержатся в виде трех изоферментов, молекулярная масса которых находится в интервале от 18 до 27 кДа [12, 15–20].

В основе механизма терапевтического действия коллагеназ лежит способность превращать посредством гидролиза пептидных связей нативный нерастворимый коллаген в растворимую форму. Истинные коллагеназы, в частности микробного и животного происхождения (класс металлопротеаз), расщепляют тройную спираль коллагена в одной специфической точке, образуя крупные растворимые фрагменты, дальнейшее разрушение которых протекает относительно медленно. Установлено, что очищенная кlostридиальная коллагеназа, как и комплекс ферментов, присутствующих в препарате «Сантил», гидролизуют нативный и денатурированный коллаген, а также коллаген-ассоциированные белки межклеточного матрикса до пептидов. Сериновые протеазы (коллагенолитические протеазы), получаемые из желудочно-кишечного тракта рыб и беспозвоночных, расщепляют три полипептидные цепи тропоколлагена, а образующиеся пептиды далее гидролизуют до аминокислот [2, 11, 12, 20–26].

Отмечается, что протеолитические ферменты в ране способствуют разжижению экссудата, облегчая доступ к бактериальной клетке для препаратов антисептиков и антибиотиков, усиливая эффект антибактериальной терапии. В исследованиях на модели инфицированного ожога крыс установлено, что применение препарата коллагеназы с 5 дня с начала формирования раны снижало бактериальную нагрузку с 10^8 до 10^5 или менее бактерий на грамм ткани. Уровень бактериальной нагрузки соответствовал нормальному заживлению раны, что способствовало ускорению репарации. Авторы исследования предполагают, что благодаря своим антимикробным свойствам и эффективности заживления ран коллагеназы могут быть безопасно использованы без сопутствующих местных антимикробных препаратов в хронически инфицированных ранах [25, 26].

В исследованиях установлено, что помимо очищения раны от некротизированных тканей, коллагеназы влияют непосредственно на процесс репарации. Так, выявлено, что коллагеназа, выделенная из *C. histolyticum*, усиливает миграцию и пролиферацию кератиноцитов, эндотелиальных клеток и фибробластов. Изучение действия препаратов бактериальной коллагеназы на модели полнослойной раны у юкатанских свиней показало, что ежедневное применение фермента с первого дня формирования раны по-

звляло добиться очищения снижения экссудации, а также эффективного ангиогенеза и эпителизации, и, в итоге, эффективного ранозаживления в более короткие сроки [28].

Репаративный эффект выявлен и у протеолитических комплексов, полученных из ракообразных. В результате исследования репаративных свойств морикрызы (препарата в форме мази на липофильной основе с коллагеназой камчатского краба) на модели спонтанных гнойно-язвенных образований у крыс выявлено полное заживление раны через 6–10 дней при ежедневном нанесении. Замечено, что дальнейшее применение мази способствовало возобновлению шерстяного покрова на месте раны [29].

Исследование репаративных свойств олеогеля с коллагеназой камчатского краба на модели ожога кожи крыс показало, что испытуемая мазь, наносимая каждый день, начиная с 3-х суток после инфицирования и формирования гнойно-некротических ран, активировала процессы эпителизации и пролиферации в поврежденных тканях, что существенно сокращало время заживления – на 10-е сутки отмечалась полная эпителизация ожоговой поверхности, десквамация струпа, в сравнении с контрольной группой, где наблюдалась неполная эпителизация [30].

В опытах на лабораторных животных (крысы) показано, что использование модифицированного хитозаном текстильного материала с иммобилизованной коллагеназой камчатского краба значительно сокращало продолжительность некролиза до 3 суток (в контроле 14 дней) и сроки заживления гнойных ран до 12 суток (контроль – 27 суток) [18].

Предприняты попытки исследования механизма влияния микробных коллагеназ на эффективность ранозаживления. В исследованиях *invitro* установлено, что при ферментализме межклеточного матрикса с помощью чистой бактериальной коллагеназы и препарата, содержащего комплекс коллагеназ, мази «Сантил», происходит высвобождение пептидов, которые активируют клеточные миграционные, пролиферативные и ангиогенные процессы при травме и способствуют заживлению раны. В исследованиях *invitro* выявлено, что фрагменты гидролиза коллагена и коллаген-ассоциированными пептиды, полученные в результате гидролиза коллагеназой эндотелия капилляров дермы и фибробластов человека, повышают пролиферацию клеток и способствуют ангиогенезу. На модели полнослойных длительно незаживающих ран мышей, продемонстрировано, что коллагеназа мази «Сантил», а также как и полученные из экстрацеллюлярного матрикса пептиды, увеличивают реэпителизацию раны на 60–100% по сравнению с контролем (физиологический раствор) при ежедневной обработке, начиная с первого дня повреждения [10].

Проведены исследования по изучению влияния мази «Сантил» на разрешение воспаления в дли-

тельно незаживающей ране. Исследование проводилось на макрофагах, выделенных из ран, обработанных мазью или вазелином (препарат сравнения), и имплантированных мышам. Было отмечено значительное увеличение прорепаративной и снижение провоспалительной поляризации макрофагов как при остром воспалительном процессе, так и при хронической диабетической ране. У раневых макрофагов в обработанной мазью группе наблюдалась повышенная продукция противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF- β , а также сниженная продукция провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β . Обработка раны клостридиальной коллагеназой ослабляла трансактивацию фактора NF- κ B и значительно уменьшала STAT6-фосфорилирование. Полученные исследования позволяют рассматривать коллагеназу как потенциальное противовоспалительное средство, которое может быть эффективным при хроническом раневом воспалении, в том числе диабетической ране [31].

Имеются многочисленные данные об эффективности использования в качестве ранозаживляющего средства препарата «Сантил» в клинической практике. Данные подтверждают, что мазь на основе коллагеназы является безопасным и эффективным средством для лечения кожных язв и ожоговых ран, способствующим уменьшению времени заживления и выраженности болевого симптома, снижению риска развития инфекции. Эффективность препарата «Сантил» для хирургической обработки раны диабетической стопы язв, пролежней и трофических варикозных язв, а также ожогов, была продемонстрирована в ряде клинических испытаний различных учреждениях (например, стационарный, амбулаторный и долгосрочный уход) [32–34].

Известны данные клинических исследований мази «Морикрол», содержащей коллагеназу камчатского краба. Использование мази у больных с длительно незаживающими кожными и ранами после пересадки кожи способствовало приживлению трансплантатов у больных, отсутствию грубых деформирующих рубцов. Выявлено уменьшение сроков заживления обширных ран слизистой ротовой полости при использовании мази «Морикрол». Отмечено, что использование средства при гнойных ранах способствовало более быстрой очистке раневой поверхности [35].

В клинических исследованиях выявлено, что совместное применение с раневым покрытием «Мультиферм» (комплекс коллагеназ камчатского краба и хитозан) фотодинамической и NO-терапии ускоряло репарацию язвенного дефекта в случае трофических язв, что проявлялось в ускорении очищения от гнойно-некротических содержимого и образовании грануляций в 2,4 раза. Также уменьшалось среднее время заживления в среднем на 9,2 суток [36].

Проводились исследования клинической эф-

фективности различных противорубцовых средств на основе коллагеназ. Эффективность коллагеназ в терапии рубцов связывают с их способностью к гидролизу избыточного коллагена [37–41]. Например, изучена возможность коррекции гипертрофических рубцов средством электрофореза в растворе слабых электролитов препаратом «Поликоллагеназа-К». Анализ состояния рубцов в процессе лечения осуществляли методом КВЧ-дieleктрометрии. Выявлена тенденция к увеличению влагосодержания ткани рубца, что было связано авторами с увеличением фракции внутриклеточной структурированной воды. Выявлено, что гидратация рубцовой ткани при воздействии препарата приближалась к величинам, свойственным здоровой коже аналогичной локализации. По утверждению авторов, увеличение содержания влаги в тканях рубца происходило за счет выделения воды при гидролизе коллагена. Отмечалась наряду с разрушением избыточного коллагена нормализация микроциркуляции [8, 39].

Доказана противорубцовая активность коллагенолитического комплекса из морских звезд: способность влиять на сокращение коллагенового геля, активность матриксных металлопротеиназ (ММП), высвобождение гидроксипролина и регуляцию активности генов фибробластов. Установлено, что комплекс значительно ингибировал сокращение коллагенового геля после 2 дней инкубирования. Выявлена выраженная активность ММП-2 и ММП-9, что проявлялось в виде высвобождения большого количества гидроксипролина. Обработка культуры клеток фибробластов значительно снижала пролиферацию фиброцитов в 3 дневных культурах. Установлена способность влиять на экспрессию генов, контролирующей воспалительную реакцию в фибробластах [42].

В клинических исследованиях противорубцовых свойств мази «Морикрол» отмечалось снижение проявлений красноты, зуда и чувства стягивания келоидных рубцов. У большей части пациентов (46 больных) в области рубца выявлялось существенное улучшение состояния кожного покрова, а именно побледнение тканей и некоторое уплощение рубцового тяжа. При пальпации отмечалось смягчение рубца и снижение тургора кожного покрова рубца. Однако, у части пациентов (18 больных) размягчения ткани не наступало, а у 5 больных с застарелыми ожоговыми рубцами ожидаемый эффект отсутствовал [35].

Имеются данные об исследовании геля (1-я группа – аппликации и 2-я – фонофорез) и раствора (3-я группа – электрофорез) для энзимной коррекции «Ферменкол»®, содержащих комплекс коллагеназ камчатского краба у пациентов с гипертрофическими и келоидными рубцами кожи различного происхождения. При использовании геля и раствора «Ферменкол»® после 1 курса лечения (10–15 дней) наблюдалось статистически достоверное замедление роста рубца, уменьшение парестезии и зуда, уменьшение

толщины рубца, исчезновение признаков воспаления. Выявлено, что применение лечебного электрофореза и ультразвука с препаратом «Ферменкол»® позволяло существенно повысить поступление препарата в кожу [41].

Проведены исследования влияния электро- и ультрафонофореза «Ферменкола» на клинические проявления патологических рубцов у 89 больных с гипертрофическими и келоидными рубцами кожи. Лечение рубцов с применением электро- и ультрафонофореза «Ферменкола» способствовало более значимой динамике клинических признаков, по сравнению с электро- и ультрафонофорезом «Контрактубекса» и «Лидазы». Максимальное снижение суммы клинических проявлений: тип, консистенция, цвет и чувствительность рубца наблюдалось под действием ультрафонофореза «Ферменкола». Дефибрирующее действие в большей степени проявлялось при сочетании препарата с ультразвуковым воздействием [43].

Разработан, запатентован и клинически апробирован способ лечения и профилактики гипертрофических и келоидных рубцов, заключающийся в инъекционном введении лидазы в толщу рубца или подрубцовую ткань с последующим нанесением на поверхность рубца влажной сетки, содержащей хитозан и коллагеназу курсом в 10–15 процедур. Апробация данного метода показала, что происходило существенное улучшение клинической картины и улучшение качества жизни пациента в сравнении с курсом сравнения (трансдермально в терапевтических дозах вводили коллагеназу и интрадермально лидазу курсом 10–15 ежедневных процедур) [44].

Проведены исследования метода коррекции рубцов кожи, образующихся в результате угревой болезни курсовым применением препарата «Ферменкол» с использованием лекарственного электрофореза. В 1-й группе использовались аппликации геля «Ферменкол» дважды в день. Во 2-й группе проводился электрофорез раствора «Ферменкол». Положительный результат отмечался у 86,4% пациентов 1-й группы и у 94,1% пациентов 2-й группы: замедление активного роста, регрессирование рубца, исчезновение неприятных субъективных ощущений, выравнивание окраски рубцовой и окружающей тканей [45].

В клинических исследованиях проведена оценка лечения гипертрофических рубцов коллагеназой в виде сухого порошка «Коллализина» (коллагеназа *Clostridium histolyticum*), смешанного с вазелиновым маслом у пациентов после оперативных вмешательств на щитовидной железе. Показано, что положительный эффект отмечен через месяц от начала использования препарата. Лечение коллагеназой продемонстрировало результаты сходные с введением в рубец гормонального противовоспалительного препарата триамцинолона [46]. Также разработан со-

став коллализина на эмульсионной основе для профилактики и лечения гипертрофических и келоидных рубцов, возникающих в результате ожогов, дерматобразии и операций в пластической хирургии [47].

Современные средства на основе коллагеназ: ассортимент на российском фармацевтическом рынке, возможности совершенствования

В литературе имеются сведения о разработанных и запатентованных препаратах на основе коллагеназ. Препарат «Коллагеназа КК» выпускался в виде лиофилизированного порошка для нанесения на поврежденные ткани в виде порошка или водных растворов, приготавливаемых *ex tempore*, которыми смачивают салфетки или тампоны [6, 17, 48]. Недостатком такой формы является то, что активность протеолитических ферментов при непосредственном внесении в рану длится 15–30 минут, т.к. ферменты подвергаются инактивации, делая терапию малоэффективной, а также относительная трудоемкость процесса [49].

Разработаны гидрофильные гели, например, гель полиэтиленоксида с коллазой [50, 51]. Сахаровым И.Ю. и соавт. для включения коллагеназы краба использовалась композиция, представляющая собой смесь винилглутарата, винилацетата и винилового спирта, переходящая в гелеобразное состояние при взаимодействии с раневым содержимым [24]. Предлагались мази на липофильных основах. Так, для мази с коллагеназой из *Clostridium histolyticum* применялась вазелиновая основа. Известна мазь морикрызы «Морикрол» на липофильной основе «Эй-конол» (смесь жирных кислот и витаминов А, Е, D и F) [19]. В данное время эти препараты на фармацевтическом рынке отсутствуют [6, 52].

Анализ источников показал, что в настоящее время средства на основе коллагеназ выпускаются в виде порошков для приготовления растворов для инъекций и проведения электрофореза, мазей, кремов и лечебных повязок [4–8, 52–55].

За рубежом выпускаются следующие коммерческие препараты – мази «Ируксол» и «Сантил» производства компании «Smith&Nephew», включающие в качестве протеолитического комплекса коллагеназу *C. histolyticum*. Следует отметить, что эти лекарственные препараты на российском фармацевтическом рынке не зарегистрированы [10, 52].

В ГРЛС представлены сведения о лекарственном препарате «Коллализин» (МНН «Коллагеназа»), ЛСР-005615/09 – протеолитическое средство, ферментный препарат, получаемый из культуры *C. histolyticum*. Коллализин обладает келлоидолитическим действием. Выпускается в виде порошка-лиофилизата дозировкой от 100 КЕ до 1000 КЕ для приготовления раствора для инъекций и электрофореза и рекомендуется для лечения ожогов, коррекции рубцов и др. [6, 52].

«Ферменкол®» (Россия) – это косметическое средство на основе ферментов коллагеназ гидробионтов, предназначенное для коррекции рубцов. Выпускается в форме геля и набора для приготовления раствора для электрофореза [54, 55].

Саморассасывающаяся повязка биологическая «Дигестол» (ЗАО «Зеленая Дубрава», Россия) – раневое покрытие (ФСР 2008/02946). Содержит сумму коллагенолитических трипсиноподобных протеаз (коллагеназ) камчатского краба. Рекомендуется к применению при гнойных и инфицированных ранах, пролежнях, трофических язвах, ожогах, при синдроме диабетической стопы. Растворяясь в раневом содержимом, раневое покрытие высвобождает фермент в активном состоянии. Некролитическое действие раневого покрытия комбинируется с противовоспалительным и активизирующим регенерацию эффектом, обусловленным наличием коллагена [8].

Также коллагеназа входит в косметическое средство сухой бальзам «Карипаин Плюс», содержащее комплекс ферментов: папаин, бромелайн и коллагеназу, предназначенное для лечения рубцов [56].

Таким образом, на российском фармацевтическом рынке в настоящее время присутствует незначительное количество средств на основе коллагеназ: лиофилизированный порошок для приготовления раствора для инъекций («Коллализин»), рекомендуемый для лечения рубцов; медицинская повязка с коллагеназой, рекомендуемые для лечения ран и некротических поражений «Дигестол»; косметические средства – гель и порошок «Ферменкол», сухой бальзам «Карипаин Плюс», рекомендованные для лечения рубцов. Лекарственные препараты представлены только порошком-лиофилизатом для приготовления растворов для инъекций и электрофореза.

Фармацевтическая разработка наружных лекарственных средств с протеолитическими ферментами, помимо обоснования оптимальной лекарственной формы, предусматривает выбор основы или носителя, обеспечивающих стабильность фермента. Анализ данных научной и технической литературы, а также патентов показал, что практически используются следующие приемы: стабилизация фермента, использование липофильной основы, иммобилизация на полимерном носителе [16, 24, 57, 58].

Так, для сохранения активности фермента в лекарственном средстве возможно применение стабилизаторов, например, солей. В частности, сульфат аммония в определенной концентрации обратимо инактивирует протеолитические ферменты путем преципитации, предотвращая их аутолиз. Сульфат-ионы взаимодействуют с аминокислотами, заряженными положительно, придавая молекуле белка более компактную форму, делая ее менее растворимой. Такой способ стабилизации фермента реализован в геле «Ферменкол®» [59].

При производстве мазей с коллагеназой из *C. histolyticum* используется вазелиновая основа («Ируксол», «Сантил»). На основе, содержащей вазелиновое масло и парафин, ранее выпускалась мазь ветеринарного назначения «Ируксоветин», содержащая коллагеназу. Использование данных основ обусловлено тем, что липофильные компоненты не содержат воды, являющейся средой для автолиза ферментов и размножения микроорганизмов-деструкторов, что позволяет сохранять активность ферментов на протяжении длительного срока [3, 4, 25].

Но вазелин как основа характеризуется рядом недостатков: обладает окклюзионным эффектом и низкой осмотической активностью, что может отрицательно отражаться на состоянии раны, которой для благоприятной репарации необходимы кислород и отток экссудата. Мази на основе вазелина вызывают неудобства при использовании, а именно плохо смываются водой, из-за выраженной вязкости с усилием распределяются по поверхности кожи. В связи с этим, актуальным направлением можно считать поиск основ, лишенных данных недостатков, но при этом обеспечивающих сохранность активности ферментов на протяжении срока хранения [5, 52].

Перспективными основами для препаратов протеолитических ферментов можно считать олеогели, например, на основе аэросила. Благодаря гелеобразной структуре гели легко наносятся и распределяются по коже. Дополнительным преимуществом этой основы может считаться то, что аэросил проявляет высокую сорбционную способность в отношении продуктов распада тканей, токсинов, микроорганизмов. Также была доказана эффективность олеогеля, содержащего силиконы, в качестве средства для лечения рубцов [60, 61].

В настоящее время в наружных лекарственных средствах используются иммобилизованные на полимерных носителях ферменты. Иммобилизация позволяет ограничить активность протеолитических ферментов поврежденной областью и повышает их стабильность в условиях раневой среды. Так, при применении ферментов, иммобилизованных на волокнообразующих носителях, существенно уменьшаются сроки очищения и заживления ран, сокращается расход препаратов в сравнении с использованием свободных ферментов [62, 63].

В качестве примера может служить получение волокнистых материалов с протеолитическими ферментами ковалентной иммобилизацией, предусматривающей активацию поверхности волокна, в частности посредством обработки окислителями с получением диальдегидцеллюлозы. На поверхности волокна формируются активные альдегидные группы, взаимодействующие с функциональными группами фермента с образованием ковалентных связей, в результате чего происходит его закрепление [63, 64].

Например, в повязке «Мультиферм» использовался сополимер на основе диальдегидцеллюлозы, обработанной хитозаном, с иммобилизованным ферментным комплексом гепатопанкреаса краба. Однако одной из проблем хитозансодержащих текстильных повязок является «ороговение» краев салфетки, связанное со структурными изменениями хитозана в процессе иммобилизации, стерилизации и хранения. В настоящее время в этом направлении проводятся исследования по получению более стабильных препаратов иммобилизованных ферментов с улучшенными функциональными свойствами [7, 65].

Одним из вариантов улучшения свойств текстильных перевязочных материалов является придание атравматических свойств с помощью водоотталкивающих пропиток, например, мазей или гелевых покрытий. Например, гидрофобная мазевая основа (повязка «Бранолид») или воск («Воскопран») не допускают прилипания к ране и травматизации грануляций при перевязках. Смена такой повязки происходит безболезненно для пациента [66].

Исходя из этого перспективными могут считаться, на наш взгляд, исследования по созданию атравматических салфеток с иммобилизованной коллагеназой на гидрофобной основе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Коллагеназы являются одними из самых эффективных протеолитических, ферментов, т.к. обладают способностью обеспечивать расщепление коллагена, являющегося главным компонентом ран и рубцов. Кроме того, имеются данные доклинических и клинических исследований, подтверждающие то, что коллагеназы различного происхождения наряду с некролитической активностью способны ускорять процесс репарации. Изучены биохимические особенности влияния коллагеназ на процесс ранозаживления, а также биохимические аспекты противовоспалительного действия коллагеназ. Имеются данные клинических исследований противорубцовых свойств коллагеназ различного происхождения, подтверждающие их эффективность при данной патологии. Одним из доступных сырьевых источников коллагенолитических ферментов в настоящее время является гепатопанкреас ракообразных, в частности камчатского краба. В силу особенностей состава, ферментам, полученным из гепатопанкреаса камчатского краба свойственна широкая специфичность: они гидролизуют как нативный коллаген, так и другие белковые субстраты (желатин, казеин, фибриноген и сывороточный альбумин). На отечественном рынке ассортимент средств на основе коллагеназы широкий, поэтому его расширение является актуальной задачей. Коллагеназа, полученная из гепатопанкреаса краба, может быть использована в качестве наиболее доступного сырья с выраженными коллагенолитическими свойствами. Преимуществом обладают гели,

как лекарственная форма более удобная в применении и производстве. Перспективными основами для наружных средств коллагенолитических ферментов можно считать олеогели на основе аэросила, благодаря их потенциальным сорбционным свойствам.

Разработка гелей и атравматических салфеток с коллагеназой, полученной из гепатопанкреаса краба как наиболее доступного сырья, с целью расширения ассортимента можно считать актуальной задачей практической фармации.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Майорова А.В., Сысцев Б.Б., Ханалиева И.А., Вихрова И.В. Современный ассортимент, свойства и перспективы совершенствования перевязочных средств для лечения ран // Фармация и фармакология. – 2018. – №1. – С. 4–32. doi:10.19163/2307-9266-2018-6-1-4-32
2. Парамонов Б.А. Коллагенолитические ферменты Часть 2. Применение для очищения ран // Косметика и медицина. – 2016. – №2. – С. 38–48.
3. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery. Part 1. Normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. // Adv Skin Wound Care. – 2012. – 25(7). – Р. 304–314. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (Дата обращения: 01.03.2019)
4. McCallon S.K., Weir D., Lantis J.C. Optimizing Wound Bed Preparation With Collagenase Enzymatic Debridement // J Am Coll Clin Wound Spec. – 2015 – 15;6(1–2):14–23. doi: 10.1016/j.jccw.2015.08.003. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (Дата обращения: 10.10.2019)
5. Видаль Ветеринар. Ветеринарные препараты в России. Справочник. – М.: РусВидель, 2017. – 448 с.
6. Энциклопедия Лекарств 2017. РЛС. Выпуск 25 / Под ред. Г.Л. Вышковского. – М.: ВЕДАНТА, 2016. – С. 1288.
7. Раневые покрытия и расходные материалы. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://poliferm.ru/multiferm> (Дата обращения: 15.05.2019)
8. Дигестол. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: mazi.ru/izdeliya_naruzhnogo_primeneniya/digestol. (Дата обращения: 15.05.2019)
9. Парамонов Б.А. Коллагенолитические ферменты. Часть 1. Нерешенные и спорные вопросы теории и практики // Косметика и медицина. – 2016. – №1. – С. 32–41.
10. Sheets AR, Demidova-Rice TN, Shi L, Ronfard V, Grover KV, Herman IM. Identification and Characterization of Novel Matrix-Derived Bioactive Peptides: A Role for Collagenase from Santyl® Ointment in Post-Debridement Wound Healing? // PLoS One. – 2016. – Vol. 26, №11(7). doi: 10.1371/journal.pone.0159598. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4961374/> (Дата обращения: 02.02.2019)
11. Конон А.Д., Петровский С.В., Шамбунова М.Ю. Уварова А.В., Козлова Ю.О., Григорьева М.В., Москвичев Б.В. Особенности биотехнологий клостридиальных коллагеназ – перспективных ферментов медицинского назначения // Медицина экстремальных ситуаций. – 2016. – № 2 (56). – С. 45–58.
12. Можина Н.В., Руденская Г.Н. Коллагенолитические ферменты патогенных микроорганизмов // Биомедицинская химия. – 2004. – Т. 50, №6. – С. 539–553.
13. Патент 2280076 РФ C12N9/48 C12N9/64 Ферментный препарат из гепатопанкреаса промысловых видов крабов и способ его получения: на изобретение / Артюков А.А., Мензорова Н.И., Козловская Э.П., Кофанова Н.Н., Козловский А.С., Рассказов В.А. (РФ) – № 2004135771/13, заявл. 06.12.04.; опубл. 20.07.2006.
14. Семенова С.А., Руденская Г.Н., Лютова Л.В., Никитина О.А. Выделение и свойства изоформысериновой коллагенолитической протеиназы камчатского краба Paralithodescamtschatica // Биохимия. – 2008. – Т. 73, вып. 10. – С. 1403–1413.
15. Патент РФ 2484811 МПК A61K 38/43 Ферментный ранозаживляющий препарат / Демина Н.С., Рототаев Д.А. (РФ) – №2011133921, заявл. 15.08.2011, опубл. 20.06.13.
16. Кульметьева М.А., Коротаева А.И., Белов А.А. Иммунизация протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба на хитозансодержащие целлюлозные носители в присутствии глицерина // Успехи в химии и химической технологии. – 2014. – Т. XXVIII. – № 5. – С. 30–32.
17. Патент РФ 2093166 МКИ6 А 61 К 35/39 Ранозаживляющее средство «Коллагеназа КК» широкого спектра действия / Козловская Э.П., Артюков А.А., Козловский А.С., Вожжова Е.И., Кофанова Н.Н., Еляков Г.Б. – №95122189/14. – заявл. 29.12.95, опубл. 20.10.97. – Бюл. №29.
18. Патент РФ 2268751 A61L15/38A61L15/32 Медицинская повязка, содержащая комплекс протеолитических ферментов, включая коллагенолитические протеазы из гепатопанкреаса краба / Белов А.А., Филатов В.Н., Белова Е.Н., Филатов Н.В. – №2003111997/15, заявл., 25.04.2003, опубл. 27.01.06. – Бюл. №3.
19. Патент РФ 2074709 A61K 9/06 Состав для лечения гнойно-трофических язв и пролежней / Исаев В.А., Лютова Л.В., Карабасова М.А., Руденская Г.Н., Купенко О.Г., Степанов В. М. – № 925054708, заявл. 10.07.1992, опубл. 10.03.1997.
20. Salamone M, Cuttitta A, Seidita G, Mazzola S, Bertuzzie F, Ricordi C, Ghersi G. Characterization of collagenolytic/ proteolytic marine enzymes // Chemical engineering transactions. – 2012. – Vol. 27, №1. – Р. 1–6.

21. Daboor SM, Budge SM, Ghaly AE, Brooks S-L, Deepika D. Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review // *Am. J. Biochem. & Biotech.* – 2010. – Vol. 6, №4. – P. 239–263.
22. Sivakumar P, Sampath P, Chandrakasan G. Collagenolytic metalloprotease (gelatinase) from the hepatopancreas of the marine crab, *Scylla serrata* // *Comparative Biochemistry and Physiology. PartB.* – 1999. – Vol. 123. – P. 273–279.
23. Зинатуллин Р.М., Хатмуллина К.Р., Гизатуллин Т.Р., Катаев В.А. Пути повышения эффективности эпителизации трофических и длительно не заживающих ран // *Медицинский вестник Башкортостана.* – 2013. – Т. 8, №6. – С. 109–111.
24. Верниковский В.В., Степанова Э.Ф. Иммобилизованные протеазы для очищения раневых поверхностей // *Российский химический журнал.* – 2010. – Т. LIV, №6. – С. 94–100.
25. Воронков А.В., Степанова Э.Ф., Жидкова Ю.Ю., Гамзалева О.Ю. Современные подходы фармакологической коррекции патологических рубцов // *Фундаментальные исследования.* – 2014. – № 3–2. – С. 301–308.
26. Сахаров И.Ю., Литвин Ф.Е., Митькевич О.В. Гидролиз белков коллагенолитическими протеиназами камчатского краба // *Биоорганическая химия.* – 1994. – Т. 20, №2. – С. 190–195.
27. Payne W.G., Salas R.E., Ko F. Enzymatic debridement agents are safe in wounds with high bacterial bioburden and stimulate healing // *Eplasty.* – 2008. – №8. – P. e17.
28. Riley Kathleen N, Herman Ira M. Collagenase promotes the cellular responses to injury and wound healing in vivo // *Journal of burns and wounds.* – 2005. – №4. – P. 112–124. [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16921413>. (Дата обращения: 01.03.2019)
29. Исаев В.Л., Лютова Л.В., Карабасова М.А. Купенко О.Г., Андреев Г.В., Руденская Г.Н. Ранозаживляющее действие мази с морикразой // *Вопросы медицинской химии.* – 1994. – Т. 40, № 3. – С. 46–48.
30. Иванкова Ю.О., Стапанова Э.Ф. Разработка мази репаративного действия с коллагеназой камчатского краба // *Успехи современного естествознания.* – 2014. – № 8. – С. 161–162.
31. Amitava Das, Soma Datta, Eric Roche, Scott Chaffee, Elizabeth Jose1, Lei Shi, Komel Grover, Savita Khanna, Chandan K. Sen, Sashwati Roy Novel mechanisms of Collagenase Santyl Ointment (CSO) in wound macrophage polarization and resolution of wound inflammation. – 2018. – №8. – P. 1696. DOI:10.1038/s41598-018-19879-w [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (Дата обращения: 12.02.2019)
32. Waycaster C, Carter MJ, Gilligan AM, Mearns ES, Fife CE, Milne CT. Comparative cost and clinical effectiveness of clostridial collagenase ointment for chronic dermal ulcers. // *J Comp Eff Res.* – 2018. – Vol. 7, №2. – P. 149–165. doi: 10.2217/ceer-2017-0066. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (Дата обращения: 12.02.2019)
33. Shi L, Carson D. Collagenase Santyl ointment: a selective agent for wound debridement // *J Wound Ostomy Continence Nurs.* – 2009. – Vol. 36–S12–6. doi: 10.1097/WON.0b013e3181bfdd1a [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (Дата обращения: 07.02.2019)
34. Pham CH, Collier ZJ, Fang M, Howell A, Gillenwater TJ. The role of collagenase ointment in acute burns: a systematic review and meta-analysis // *Wound Care.* – 2019. – Vol. 28, №1 (Sup 2). – P. S9–S15. doi: 10.12968/jowc.2019.28.Sup2.S9. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30767636> (Дата обращения: 01.03.2019)
35. Руденская Г.Н., Лютова Л.В., Карабасова М.А., Андреев Г.В., Исаев В.А., Брусков А.В., Баднина Е.И., Резникова А.Е., Агеева Л.В. Лечебное действие мази морикрол // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* – 2000. – Т. 41. № 6 – С. 414–416.
36. Луцевич О.Э., Тамразова О.Б., Кулешов И.Ю., Сорокатый А.А., Шикунова А.Ю., Усмонов У.Д., Старичков И.Г. Воздушно-плазменные потоки в режиме коагуляции, по-терапии в комплексном лечении длительно незаживающих и хронических ран (язв) нижних конечностей // *Московский хирургический журнал.* – 2011. – №2 (18). – С. 9–13.
37. Карпова Т.Н., Матыцин В.О. Оценка эффективности применения средства «Ферменкол» в целях профилактики и коррекции рубцов // *Физиотерапевт.* – 2008. – №6. – С. 53–54.
38. Олейник Г.А., Григорьева Т.Г., Коркунда С.В., Цогоев А.А. Опыт использования препарата «Ферменкол» в профилактике и лечении патологических рубцов // *Вестник неотложной и восстановительной медицины.* – 2014. – Т. 15, №1. – С. 90.
39. Парамонов Б.А., Турковский И.И., Антонов С.Ф., Климова О.В., Семенов Д.П., Бондарев С.В. Разрушение избыточного внеклеточного матрикса как составляющая лечения патологических рубцов кожи (оценка in vitro) // *Вестник Эстетической Медицины.* – 2009. – Т. 8, №3. – С. 69–73.
40. Парамонов Б.А., Турковский И.И., Антонов С.Ф., Климова О.В., Семенов Д.П., Бондарев С.В. Ферментная терапия патологических рубцов кожи // *Вестник эстетической медицины.* – 2009. – Т. 8, №2. – С. 24–28.
41. Часнойть А.Ч., Жилинский Е.В., Серебряков А.Е., Тимошок Н.Ю. Оценка противорубцовой эффективности препарата Ферменкол. // *Международные обзоры: клиническая практика и здоровье.* – 2016. – №1(19). – С. 24–34.
42. Zhi Jiang Li, Sang Moo Kim The Application of the Starfish Hatching Enzyme for the Improvement of Scar and Keloid Based on the Fibroblast-Populated Collagen Lattice // *Applied Biochemistry and Biotechnology.* – 2014. – Vol. 173, №4, P. 989–1002.
43. Карпова Т.Н., Пономаренко Г.Н., Самцов А.В. Электро- и ультрафонофорез коллагеназы в коррекции рубцов кожи // *Вестник Рос. Военно-мед. академии.* – 2009. – №1. – С. 89–94.
44. Патент РФ 2220741A61L 15/38A61L 15/32 Способ лечения и профилактики развития келоидных и гипертрофических рубцов / Зинатуллин Р.М., Гильманов А.Ж., Хунафин С.Н., Симонова Э.С. – №2002105074/14; заявл. 26.02.2002, опубл. 10.01.2004. – Бюл. 1.
45. Шиманская И.Г., Волотовская А.В. Методы коррекции рубцовых изменений кожи у пациентов на фоне угревой болезни // *Медицинские новости.* – 2015. – №9. – С. 38–40.

46. Трунин Е.М., Кандалова И.Г., Нынь И.В., Берестовая Л.К., Обрезкова А.В. Использование Коллализина для лечения гипертрофических рубцов после операций на щитовидной железе // Поликлиника – 2009. – №1. – С. 120–121.
47. Патент РФ 2114603 А61К 7/00А61К 9/06А61К 35/74Средство для профилактики и лечения гипертрофических и келоидных рубцов / Замыслова Т.И., Каракова Т.А., Степанова З.В. (РФ) – №96122994/14, заявл. 04.12.1996, опубл. 10.07.1998.
48. Стоник В.А. Морские природные. Соединения путь к новым лекарственным препаратам // Actanaturae – 2009. – №2. – С. 16–27.
49. Перцев И.М., Даценко Б.М., Гунько В.Г. Многокомпонентные мази на гидрофильной основе // Фармация. – 1990. – Т. 39, №5. – С. 73–77.
50. Островидова Г.У., Макеев А.В. Направленное регулирование биологической активности многокомпонентных полимерных структур // Российский журн. приклад. химии. – 2002. – Т. 75, №9. – С. 1477–1480.
51. Омигов В.В., Маркович Н.А., Балахнин С.М., Малыгин Э.Г., Зиновьев В.В., Сандахчиев Л.С. Морфологическая оценка воздействия коллагеназы камчатского краба *Paralithodes camtschatica* на термический ожог в эксперименте // Бюл. exper. биол. и медицины. – 1996. – Т. 122, № 7. – С. 97–100.
52. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] – М-во здравоохранения РФ. М., 2019. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>. (Дата обращения: 09.04.2019)
53. Государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий. М., 2019. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.roszdravnadzor.ru/services/misearch> (Дата обращения: 09.04.2019)
54. Ферменкол [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://fermenkol.ru/fermenkol>. (Дата обращения: 12.05.2019)
55. Пересадына С.К., Васин А.С. Применение фонофореза геля ферменкол в лечении рубцов постакне // Дерматология в России. – 2017. – Прил. 1. – 75–76.
56. Фисталь Н.Н. Оценка эффективности препарата «Кари-Плюс» в лечении послеожоговых рубцов // Поликлиника. – 2012 – №4–1. – С. 118–119.
57. Распопова Е.А., Коротаева А.И., Маленко О.Э., Белов А.А. Кинетика термоинактивации протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба, стабилизированного полисахаридными соединениями // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11 (ч. 4). – С. 656–661.
58. Перламутров Ю.Н., Ольховская К.Б. Эффективность крема, содержащего стабилизированную гиалуронидазу, для коррекции рубцовых изменений кожи // Дерматология. Приложение к журналу CONSILIUM MEDICUM. – 2017. – №1. – С. 5–9.
59. Патент РФ 2462265 (13) С1 Способ трансдермального введения полипептидов в организм / Климова О.А. – №2011134828/15, 16.08.2011, заявл. 16.08.2011, опубл. 27.09.2012. – Бюл. № 27.
60. Иванкова Ю.О., Верниковский В.В., Степанова Э.Ф. Исследования по выбору основы для наружной лекарственной формы коллагеназы // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №2. – С. 478.
61. Астраханова М.М. Изучение реологических свойств и высвобождения из аэроилсодержащих мазевых основ // Фармация. – 1981. – Т. 29, №6. – С. 28–31.
62. Сысцев Б.Б., Ахметов Н.М., Самошина Е.А., Залеских Д.С., Иванилова М.А., Самарская А.А., Барбарош О.С. Современные аспекты применения нанотехнологий при разработке лекарственных форм нового поколения // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. – №3 (12). – С. 88–96.
63. Белов А.А., Белова Е.Н., Филатов В.Н. Текстильные материалы, содержащие хитозан и протеолитический комплекс из гепатопанкреаса краба, для медицинских целей // Биомедицинская химия. – 2009. – Т. 55, №1 – С. 61–67.
64. Распопова Е.А., Коротаева А.И., Маленко О.Э., Белов А.А. Кинетика термоинактивации протеолитического комплекса из гепатопанкреаса краба, стабилизированного полисахаридными соединениями // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11 (ч. 4). – С. 656–661.
65. Шуршина А.С., Кулиш Е.И., Колесов С.В., Захаров В.П. Получение ферментсодержащих хитозановых пленок // Хим-фарм. журнал. – 2015 – Т. 49, № 3. – С. 43–45.
66. Веселов А.Э. Опыт использования раневых покрытий «Воскопран®», «Парапран®», «Воскосорб®», «Геле-пран®» в комплексном лечении детей с ожоговой травмой // Медицинская сестра. – 2008. – №3. – С. 33.

АВТОРЫ

Майорова Алена Валентиновна – кандидат фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой эстетической медицины факультета повышения квалификации медицинских работников Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов». ORCID ID – 0000-0003-1764-0592. E-mail: 1263220@bsu.edu.ru

Сысцев Борис Борисович – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). ORCID ID – 0000-0002-9933-1808. E-mail: bsb500@yandex.ru.

Иванкова Юлия Олеговна – аспирант кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии ПМФИ – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава. ORCID ID: 0000-0003-1418-9011. E-mail: julia_iv@bk.ru.

Ханалиева Исида Адылмажитовна – ассистент кафедры эстетической медицины Факультета повышения квалификации медицинских работников Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов». ORCID ID – 0000-0003-4226-1934. E-mail: medesta@yandex.ru

УДК 519.865.3:544.015.5:633.88:582.998



ИЗУЧЕНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЦВЕТКОВ БЕССМЕРТНИКА ПЕСЧАНОГО МЕЖДУ ФАЗАМИ ЭКСТРАКЦИОННОЙ СИСТЕМЫ

Н.Н. Бойко¹, Е.Т. Жиликова¹, А.Ю. Малютина¹, Д.К. Наплеков¹, Н.Н. Шестопалова¹,
Д.С. Марцева¹, О.О. Новиков², Д.И. Писарев², П.Г. Мизина³

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки России 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85

² Центр коллективного пользования (научно-образовательный центр) «Центр контроля качества лекарств», ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8/2

³ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, 7

E-mail: boykoniknik@gmail.com

Получено 16.09.2019

Рецензия (1) 10.10.2019

Рецензия (2) 15.10.2019

Принята к печати 21.10.2019

Цель. Проверка адекватности выдвигаемой рабочей гипотезы, которая объясняет и количественно описывает распределение БАВ в экстракционной системе из цветков бессмертника песчаного и растворителя, с помощью регрессионного анализа в предсказанных теорией координатах.

Материалы и методы. Для исследований использовали измельченное фармакопейное растительное сырье «Бессмертника песчаного цветки» (*Helichrysum arenarium* L. flores). Анализ извлечений проводили с помощью ОФ ВЭЖХ метода. В качестве стандартных веществ использовали изосалипурпозид, салипурпозид, хлорогеновую кислоту ФСО ГФУ, содержание $\geq 98,0\%$. Аналитические длины волн 370, 290 и 325 нм.

Результаты. Экспериментальные данные хорошо аппроксимируются регрессионными линейными уравнениями в предсказанных теорией координатах $1/C=f(V)$ и $\ln(b/a)=f(1/T)$. При этом коэффициент детерминации регрессионных уравнений, имеет значение $R^2 \geq 0,998$, что говорит о функциональной зависимости между изучаемыми параметрами и подтверждает адекватность разработанных уравнений. Эксперимент выявил необходимость введения в математическую модель дополнительной константы.

Заключение. Предложена рабочая гипотеза, которая объясняет и количественно описывает распределение БАВ в экстракционной системе из цветков бессмертника песчаного и этанола 80 % об. С помощью рабочей гипотезы разработаны математические модели, адекватность которых доказана с помощью регрессионного анализа в предсказанных теорией координатах. Полученные результаты не отвергают гипотезу, что механизм распределения БАВ между фазами в экстракционной системе объясняется и описывается классическим распределением Больцмана для дискретных значений энергии молекул (или квантовым распределением Ферми-Дирака).

Ключевые слова: цветки бессмертника песчаного; *Helichrysum arenarium*, изосалипурпозид; салипурпозид; хлорогеновая кислота; равновесие; классическое распределение Больцмана для дискретных значений энергии молекул

Для цитирования: Н.Н. Бойко, Е.Т. Жиликова, А.Ю. Малютина, Д.К. Наплеков, Н.Н. Шестопалова, Д.С. Марцева, О.О. Новиков, Д.И. Писарев, П.Г. Мизина. Изучение распределения биологически активных веществ из цветков бессмертника песчаного между фазами экстракционной системы. *Фармация и фармакология*. 2019;7(5): 271-278. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-271-278

© Н.Н. Бойко, Е.Т. Жиликова, А.Ю. Малютина, Д.К. Наплеков, Н.Н. Шестопалова, Д.С. Марцева, О.О. Новиков, Д.И. Писарев, П.Г. Мизина, 2019

For citation: N.N. Boyko, E.T. Zhilyakova, A.Yu. Malyutina, D.K. Naplekov, N.N. Shestopalova, D.S. Martceva, O.O. Novikov, D.I. Pisarev, P.G. Mizina. Study of distribution of biologically active substances from flowers of *helichrysum arenarium* between phases of the extraction system. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(5): 271-278. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-271-278

STUDY OF DISTRIBUTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM FLOWERS OF HELICHRYSUM ARENARIUM BETWEEN PHASES OF THE EXTRACTION SYSTEM

N.N. Boyko¹, E.T. Zhilyakova¹, A.Yu. Malyutina¹, D.K. Naplekov¹, N.N. Shestopalova¹,
D.S. Martceva¹, O.O. Novikov², D.I. Pisarev², P.G. Mizina³

¹ Laboratory of Drugs Technology, ^bDepartment of Pharmaceutical Technology,
Belgorod National Research University
85, Pobeda Str., Belgorod, Russia 308015

² Test Department "Drugs quality control center" of the Shared Research and Education Center
Peoples' Friendship University of Russia, 8/2, Miklukho-Maklay Str., Moscow, Russia 117198

³ All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants
7, Grin Str., Moscow, Russia 117216

E-mail: boykoniknik@gmail.com

Received 6 September 2019 Review (1) 10 October 2019

Review (2) 15 October 2019

Accepted: 21 October 2019

The aim of this study is to confirm the adequacy of the proposed hypothesis, which explains and quantitatively describes the distribution of biologically active substances (BAS) within the extraction system consisting of *Helichrysum arenarium* flowers and the solvent using a regressive analysis for the theoretically predicted coordinates.

Materials and methods. For this research, milled officinal flowers of *Helichrysum arenarium* (*Helichrysum arenarium* L. flores) were used. The analysis of the extractions was carried out by RP HPLC method. Isosalipurposide, salipurposide, and chlorogenic acid of $\geq 98.0\%$ purity were used as reference substances. The analytical wavelengths were 370, 290, and 325 nm.

Results. The obtained experimental data are well-approximated by regressive linear equations in the theoretically predicted coordinates $1/C=f(V)$ and $\ln(b/a)=f(1/T)$. Wherein, the coefficient of determination of regressive equations was $R^2 \geq 0.998$, which indicates functional dependence between the studied parameters and confirms the adequacy of the developed mathematical model. The experimental work identified the necessity of implementation of additional constant values into the mathematical model.

Conclusion. A new hypothesis was proposed to explain and quantitatively describe the distribution of BAS in the extraction system of *Helichrysum arenarium* flowers and 80% ethanol. With this working hypothesis, mathematical models were developed and their adequacy was proved using a regressive analysis in the theoretically predicted coordinates. The results obtained could not deny that a mechanism of BAS distribution between the phases is explained and described by the classic Boltzmann distribution for discrete values of molecular energy (or quantum distribution according to Fermi and Dirac).

Keywords: flowers of *Helichrysum arenarium*; isosalipurposide; salipurposide; chlorogenic acid; equilibrium; classic Boltzmann distribution for discrete values of molecular energy

ВВЕДЕНИЕ

Бессмертника песчаного цветки (*Helichrysum arenarium* flores) являются фармакопейным растительным сырьем на территории РФ, Республики Беларусь, Украины, Казахстана и др. Из данного вида сырья производится лекарственное средство «Фламин», которое выпускается в виде таблеток, гранул, субстанции и используется для лечения некоторых видов заболеваний печени и желчного пузыря. Помимо этого, биологически активные вещества (БАВ) из цветков бессмертника песчаного проявляют антиоксидантные, антибактериальные, антивирусные, антигиперлипидесические, цитотоксические эффекты [1–20].

В предыдущей работе [21], авторы обосновали механизм влияния диэлектрической постоянной растворителя на равновесную концентрацию изосалипурпозида в извлечениях. Однако получен-

ная модель не объясняет и не описывает механизм распределения БАВ в экстракционной системе при наступлении в ней состояния равновесия. Поэтому исследования направленные на развитие теории равновесного состояния экстракционного процесса являются актуальными.

ЦЕЛЬ данной работы – проверка адекватности выдвинутой рабочей гипотезы, которая объясняет и количественно описывает распределение БАВ в экстракционной системе из цветков бессмертника песчаного и растворителя, с помощью регрессионного анализа в предсказанных теорией координатах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сырье и химические реактивы

Для исследований использовали измельченное фармакопейное растительное сырье «Бессмертника песчаного цветки» (*Helichrysum arenarium* L. flores),

которое приобреталось в аптеке ООО «Лекарственные травы», г. Харьков, Украина, серия № 530617, срок годности до 07.2020 г. [22].

В качестве экстрагента использовали водный раствор этанола 80±1% об. Качественный и количественный анализ проводили с помощью ОФ ВЭЖХ анализа по стандартным веществам.

В качестве стандартных веществ использовали изосалипурпозид, салипурпозид, хлорогеновую кислоту ФСО ГФУ, содержание ≥98,0%. Аналитические длины волн 370, 290 и 325 нм.

Основные параметры валидации метода анализа и пригодности ОФ ВЭЖХ системы для определения изосалипурпозид, салипурпозид, хлорогеновой кислоты представлены в табл. 1.

Методика получения извлечений

Точную навеску растительного сырья (точная масса навески составляла 1 г), помещали в герметичный флакон, добавляли необходимый объем растворителя, который также взвешивали и ставили в холодильник/термостат с температурой 4, 20, 40 и 60±1°C. Соотношение ЛРС/растворитель при каждой температуре составляло 1:5 (1:10), 1:15, 1:20, 1:40 масс./об. Экстракционную смесь выдерживали в течение 24 ч, извлечение сливали и проводили количественный анализ с помощью ОФ ВЭЖХ метода. Среднее значение и ошибку среднего, рассчитывали при числе повторов $n=3$ и доверительной вероятности $P=0,95$.

Методика анализа ОФ ВЭЖХ

Анализ извлечений проводили с помощью хроматографа фирмы «Agilent Technologies» серии «Agilent 1200 Infinity», производства США. Подробно методика анализа приведена в работе [21, 23].

Теоретическая часть

Для объяснения механизма и количественного описания распределения БАВ между твердой фазой ЛРС и жидкой фазой растворителя, авторы выдвинули рабочую гипотезу – механизм равновесного распределения молекул БАВ, между фазами в экстракционной системе, объясняется и описывается классическим распределением Больцмана для дискретных значений энергии молекул (или квантовым распределением Ферми-Дирака), уравнение (1). Данная рабочая гипотеза позволяет разработать математическую модель, которая должна описывать экспериментальные данные в предсказанных теорией координатах, в виде уравнений (2) и (3):

$$\frac{n}{n_0} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G}{kT}\right)} \quad (1)$$

где n – количество БАВ в растворителе с энергией ΔG , моль;

n_0 – общее количество БАВ, моль;

ΔG – изменение энергии Гиббса для молекул БАВ в экстракционной системе, Дж;

k – постоянная Больцмана, $1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж/К;

T – абсолютная температура в кельвинах, К.

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{n_0} \cdot V + \exp\left(\frac{\Delta G}{kT}\right) \cdot \frac{1}{n_0} = \frac{M}{m_0} \cdot V + K_H \cdot \frac{M}{m_0} = a \cdot V + b \quad (2)$$

$$\ln K_H = \ln\left(\frac{b}{a}\right) = \frac{1}{T} \cdot \frac{\Delta G}{k} \quad (3)$$

где C – концентрация БАВ в экстрагенте, г/мл;

m_0 – общее (исходное) содержание БАВ в растительном сырье, г;

V – объем экстрагента, мл;

M – масса ЛРС в экстракционной системе, г;

a – константа, равная обратной величине общего содержания БАВ в ЛРС (M/m_0);

b – константа, равная произведению константы

Генри (K_H) и обратной величины общего содержания БАВ в ЛРС (M/m_0), мл/г.

Для выявления степени адекватности выдвигаемой рабочей гипотезы, авторы использовали регрессионный анализ экспериментальных данных в координатах предсказанных теорией $1/C=f(V)$ и $\ln(b/a)=f(1/T)$. Анализ данных проводили с помощью надстройки анализ данных в MS Excel 2010.

Таблица 1 – Основные параметры валидации метода анализа и пригодности ОФ ВЭЖХ системы для определения изосалипурпозид, салипурпозид, хлорогеновой кислоты

Параметр	Фармакопейное условие [22]	Изосалипурпозид	Салипурпозид (сумма изомеров)	Хлорогеновая кислота
1. Время удерживания, мин*	-	20,1±0,2	11,9±0,2 и 12,8±0,2	6,3±0,3
2. Коэффициент разделения	≥1,5	3,0	3,1 и 3,2	11,0
3. Число теоретических тарелок	≥1000	103458	39541 и 29267	12282
4. Относительное стандартное отклонение, RSD, %	≤2,0	1,2	1,2	0,8
5. LOD, г/мл	–	4,1·10 ⁻⁵	5,5·10 ⁻⁶	2,2·10 ⁻⁵
6. LOQ, г/мл	–	1,3·10 ⁻⁴	1,7·10 ⁻⁵	6,5·10 ⁻⁵
7. Коэффициент детерминации, r ²	≥0,98	0,9999	0,9999	0,9999
8. Линейное регрессионное уравнение, C(г/мл)=f(S(м·ПЕ·сек))	-	C=(2,79±0,06)·10 ⁻⁷ ·S	C=(3,94±0,01)·10 ⁻⁷ ·S	C=(2,92±0,04)·10 ⁻⁷ ·S

* Примечание. Среднее значение и его ошибку ($\bar{X} \pm \Delta \bar{X}$) вычисляли при числе повторов $n=3$ и уровне значимости $P=0,95$.

Таблица 2 – Значения констант для БАВ из цветков бессмертника песчаного

БАВ	Константа		
	ΔG , Дж/моль	g	m_p , % масс.
1. Изосалипурпозид	5390±380	-1,5±0,2	22,0±3,0
2. Салипурпозид	19930±1030	-7,2±0,4	0,075±0,004
3. Хлорогеновая кислота	18640±2160	-5,4±0,9	0,45±0,08

Примечание. Наблюдений $n=4$, уровень доверительной вероятности $P=0,95$.

Таблица 3 – Значения величины общего (исходного) содержания БАВ в ЛРС (m_0), которые были найдены экспериментальным и теоретическим путем

БАВ	Теоретически рассчитанное значение, m_0/M , % масс.*	Экспериментальное значение, m_0/M , % масс.**
1. Изосалипурпозид	1,58±0,06	1,46±0,07
2. Салипурпозид	0,47±0,02	0,43±0,02
3. Хлорогеновая кислота	0,19±0,04	0,19±0,01

Примечание. * Наблюдений $n=4$, уровень доверительной вероятности $P=0,95$.

** Количество повторов $n=3$, уровень доверительной вероятности $P=0,95$.

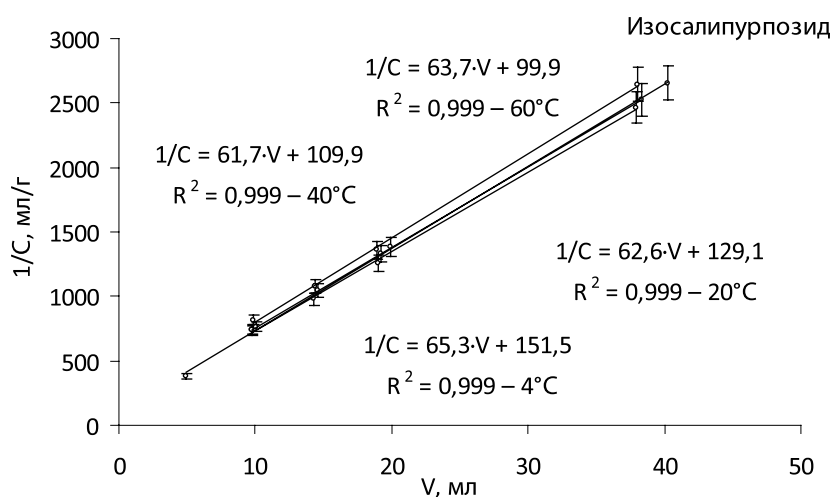


Рисунок 1 – Регрессионные уравнения зависимости концентрации изосалипурпозид в извлечениях от объема экстрагента в координатах $1/C=f(V)$

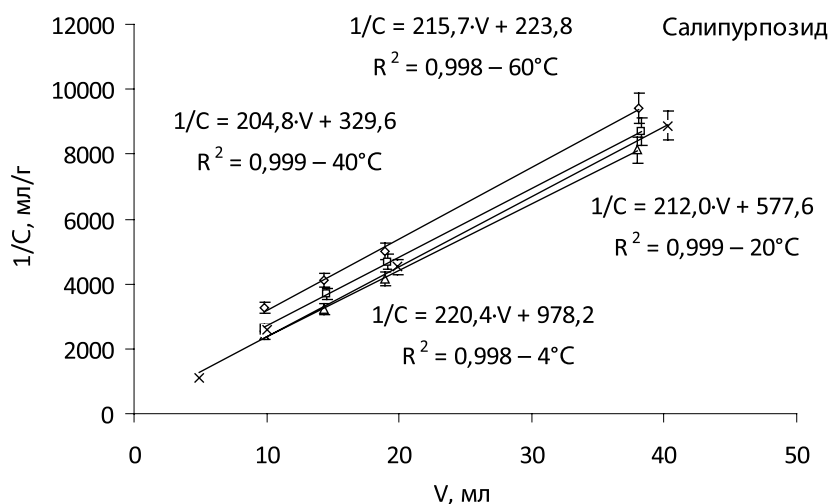


Рисунок 2 – Регрессионные уравнения зависимости концентрации салипурпозид в извлечениях от объема экстрагента в координатах $1/C=f(V)$

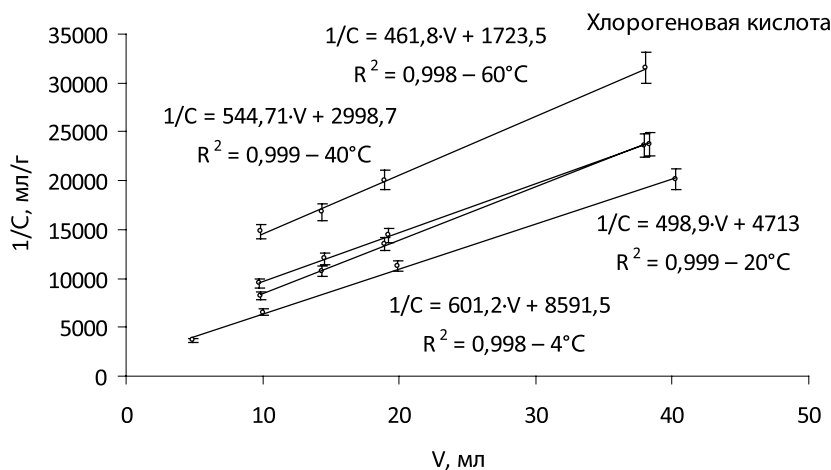


Рисунок 3 – Регрессионные уравнения зависимости концентрации хлорогеновой кислоты в извлечениях от объема экстрагента в координатах $1/C=f(V)$

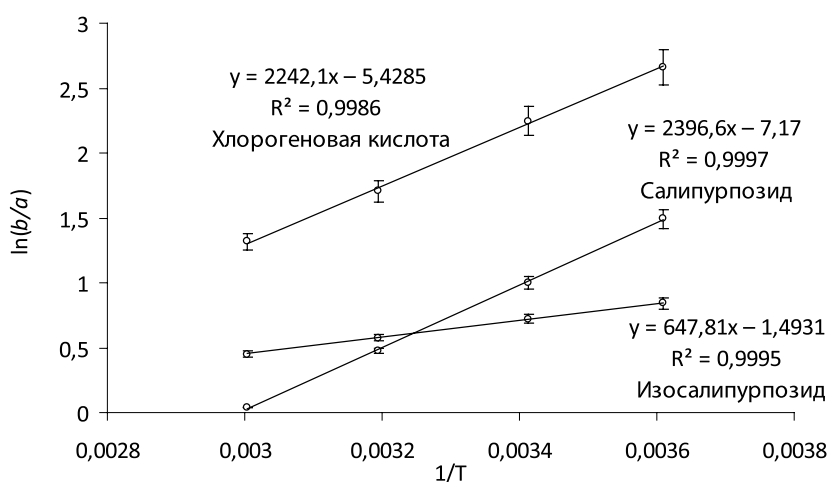


Рисунок 4 – Регрессионные уравнения зависимости эмпирических констант (a, b) от температуры в координатах $\ln(b/a)=f(1/T)$ для БАВ из цветков бессмертника

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальные данные и регрессионные линейные уравнения зависимости концентрации изосалипурпозиды, салипурпозиды и хлорогеновой кислоты в извлечениях от объема экстрагента в координатах, предсказанных теорией, представлены на рис.1, 2 и 3.

Как видно из представленных данных на рис. 1, 2 и 3 экспериментальные точки очень хорошо аппроксимируются регрессионными линейными уравнениями в предсказанных теорией координатах $1/C=f(V)$. При этом коэффициент детерминации, имеет значение $R^2 \geq 0,998$, что говорит о функциональной зависимости между изучаемыми параметрами и подтверждает адекватность уравнения (2).

Далее, полученные результаты использовали для построения регрессионных линейных уравнений зависимости константы Генри для изосалипурпозиды, салипурпозиды и хлорогеновой кислоты от температуры в координатах, предсказанных теорией, которые представлены на рис.4.

Как видно из представленных данных на рис.4, зависимость константы Генри от температуры для изосалипурпозиды, салипурпозиды и хлорогеновой кислоты, очень хорошо аппроксимируются регрессионными линейными уравнениями в предсказанных теорией координатах $\ln(b/a)=f(1/T)$. При этом коэффициент детерминации, также имеет высокое значение $R^2 \geq 0,998$, что говорит о функциональной зависимости между изучаемыми параметрами и подтверждает адекватность уравнения (3). Однако полученные результаты выявили дополнительную константу (g) в уравнении (3), которая не предсказывалась теорией, что требует внесения экспериментально найденной константы ($g=\ln(m_p/100)$) в исходное уравнение (1).

Значения констант (ΔG , g и m_p) для БАВ из цветков бессмертника песчаного, которые были найдены согласно теоретически предложенных уравнений (2) и (3), а также эксперимента, представлены в табл.2.

Как видно из табл. 2, константа ΔG , которая выражает энергетику процесса распределения БАВ между фазами находится на уровне 5–20 кДж/моль, что хорошо согласуется со значениями физической адсорбции веществ на адсорбентах [24]. Данный факт говорит о том, что БАВ в ЛРС находятся в связанном, вероятнее всего адсорбционном состоянии, как это обнаружил еще в начале XX века Цвет М.С. [25].

Заключительную проверку выдвигаемой рабочей гипотезы проводили с помощью сравнения экспериментально найденных и теоретически рассчитанных значений общего (исходного) содержания БАВ в ЛРС (m_o/M), которые представлены в табл. 3.

Как видно из табл.3, экспериментально найденные и теоретически рассчитанные значения общего (исходного) содержания БАВ в цветках бессмертника песчаного (m_o/M), достоверно не отличаются, друг от друга. Это дополнительно подтверждает адекватность уравнения (2).

Таким образом, полученные экспериментальные результаты хорошо согласуются с теоретически разработанными математическими моделями в виде уравнений (2) и (3). Однако эксперимент выявил необходимость введения в математическую модель дополнительной константы (g), при этом уравнение (1), примет следующий вид:

$$\frac{n}{n_o} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G}{kT} - g\right)} \quad (4)$$

Следовательно, выдвигаемая рабочая гипотеза относительно того, что механизм распределения БАВ между фазами в экстракционной системе объясняется и описывается классическим распределением Больцмана для дискретных значений энергии молекул (или квантовым распределением Ферми-Дирака), не отвергается.

В целом выдвигаемая рабочая гипотеза и раз-

работанная на ее основе математическая модель: объясняет механизм распределения БАВ в экстракционной системе между фазами; позволяет найти необходимые константы; прогнозировать равновесную (предельную) концентрацию БАВ в извлечении; и подобрать/рассчитать оптимальные значения объема и температуры экстрагента для достижения заданной степени истощения ЛРС по БАВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена рабочая гипотеза, которая объясняет и количественно описывает распределение БАВ в экстракционной системе из цветков бессмертника песчаного и этанола 80% об.

С помощью рабочей гипотезы разработаны математические модели, адекватность которых доказана с помощью регрессионного анализа в предсказанных теорией координатах.

Найдены значения констант, которые входят в математическую модель. Экспериментально обнаружена необходимость введения в модель дополнительной константы.

Полученные результаты не отвергают гипотезу, что механизм распределения БАВ между фазами в экстракционной системе объясняется и описывается классическим распределением Больцмана для дискретных значений энергии молекул (или квантовым распределением Ферми-Дирака).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают свою искреннюю благодарность Литвиненко Василию Ивановичу, д.хим.н., проф., заведующему лабораторией фитохимии и технологии готовых лекарственных форм государственного предприятия «Государственный научный центр лекарственных средств и медицинской продукции», г. Харьков, Украина за предоставление стандартных веществ.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Результаты получены в рамках выполнения государственного задания № 12.6429.2017/БЧ «Комплексные исследования объектов растительного происхождения в процессе создания ряда целевых лекарственных форм для проктологии».

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Helichrysum arenarium subsp. arenarium: phenolic composition and antibacterial activity against lower respiratory tract pathogens / A.C. Gradinaru [et al.] // Natural Product Research. 2014. Vol. 28, Is. 22. P. 2076–2080. DOI: 10.1080/14786419.2014.924931.
2. Sandy Everlasting (Helichrysum arenarium (L.) Moench): Botanical, Chemical and Biological Properties / D. Pljevljaković [et al.] // Front. Plant. Sci. 2018. Vol. 9. P. 1123. DOI: 10.3389/fpls.2018.01123.
3. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of Helichrysum arenarium (L.) Moench. and Antennaria dioica (L.) Gaertn. Flowers / M. Babotă [et al.] // Molecules. 2018. Vol. 23, Is. 2. P. 409. DOI: 10.3390/molecules23020409.
4. Anti-atherosclerotic activities of flavonoids from the flowers of Helichrysum arenarium L. Moench through the pathway of anti-inflammation / Z. Mao [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. Vol. 27. P. 2812–2817. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.04.076.
5. WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS). Geneva: World Health Organization, 2010. 441 p.
6. Effect of flavone fractions of Helichrysum arenarium on liver lesions / J. Jelinek [et al.] // Cesk Fysiol. 1960. Vol. 9. P. 289–290. (in Czech)
7. Rashba E., Mostovova G. Relation of the antibacterial properties of Arenarin to the time of harvesting of Helichrysum arenarium and other factors // Mikrobiol Zh. 1962. Vol. 24, Is. 2. P. 48–55. (in Ukr)
8. Szadowska A. Pharmacological action of the galenicals and flavonoids isolated from Helichrysum arenarium // Acta Pol Pharm. 1962. Vol. 19. P. 465–479. (in Polish)
9. In vitro antioxidant properties of Helichrysum arenarium (L.) Moench. / E. Czinier [et al.] // J Ethnopharmacol. 2000. Vol. 73, Is. 3. P. 437–43. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00304-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00304-4).
10. Противотуберкулезная активность экстракта бессмертника песчаного (Helichrysum arenarium) in vitro / В.В. Скворцова [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78, N 2. С.30–33.
11. Anti-atherosclerotic activities of flavonoids from the flowers of Helichrysum arenarium L. Moench. through the pathway of anti-inflammation / Z. Mao [et al.] // Bioorg Med Chem Lett. 2017. Vol.27, Is. 12. P. 2812–2817. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.04.076.
12. Гудзенко А.В., Цуркан А.А. Разработка подходов к стандартизации цветков бессмертника песчаного (Helichrysum arenarium (L.) Moench) в растительных смесях // Фармация и фармакология. 2014. Т. 2, N 1(2). С. 29–34. DOI: [https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-1\(2\)-29-34](https://doi.org/10.19163/2307-9266-2014-2-1(2)-29-34).
13. Cytogenetic effects of Helichrysum arenarium in human lymphocytes cultures / H.E. Eroğlu [et al.] // Turk J Biol. 2010. Vol. 34. P. 253–259. DOI: 10.3906/biy-0906-31.
14. Helichrysum italicum: From traditional use to scientific

- data. Review / D.A. Viegas [et al.] // Journal of Ethnopharmacology. 2014. Vol. 151, Is. 1. P. 54–65. DOI: 10.1016/j.jep.2013.11.005.
15. Phytochemical Analysis, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. and *Antennaria dioica* (L.) Gaertn. Flowers / M. Babotă [et al.] // Molecules. 2018. Vol. 23, Is. 2. P. 409. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23020409>.
 16. Попова Н.В., Литвиненко В.И., Куцян А.С. Лекарственные растения мировой флоры: энциклопед. справочник. Харьков: Діа плюс, 2016. 540 с.
 17. Куркина А.В., Рыжов В.М., Авдеева Е.В. Определение содержания изосалипурпозидов в сырье и препаратах бессмертника песчаного // Химико-фармацевтический журнал. 2012. Т. 46, N 3. С.28–33. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11094-012-0753-9>.
 18. Літвіненко В.І., Попова Н.В., Волькович О.О. Цмини – ботанічна характеристика, хімічний склад та застосування // Фармаком. 2001. N 9. С. 9–15. (на Укр.)
 19. *Helichrysum arenarium* subsp. *arenarium*: phenolic composition and antibacterial activity against lower respiratory tract pathogens / A.C. Gradinaru [et al.] // Natural Product Research. 2014. Vol. 28, Is. 22. P. 2076–2080. DOI: 10.1080/14786419.2014.924931.
 20. Biologically active compounds of *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. Eur / E. Czinner [et al.] // J Drug Metab Pharmacokinet. 1999. Vol. 24, Is. 4. P. 309–313. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03190038>.
 21. Изучение и моделирование влияния растворителя на экстракцию изосалипурпозидов из *Helichrysi arenarii* flores / Н.Н. Бойко [и др.] // Фармация и фармакология. 2018. Т. 6, N 4. С. 340–350. DOI: 10.19163/2307-9266-2018-6-4-340-350
 22. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I и IV. Москва: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018.
 23. Studying the polyphenolic structure of *Laurus Nobilis* L. leaves / E.T. Zhilyakova [et al.] // Indo Am. J. Pharm. Sci. 2017. Vol. 4, Is. 9. P. 3066–3074.
 24. Макаревич Н.А. Богданович Н.И. Теоретические основы адсорбции: учебное пособие. Архангельск: САФУ, 2015. 362 с.
 25. Цвет М. С. Хроматографический адсорбционный анализ. М.: Издательство Юрайт, 2017. 206 с.

АВТОРЫ:

Бойко Николай Николаевич – кандидат фармацевтических наук, младший научный сотрудник лаборатории технологии лекарств, доцент кафедры фармацевтической технологии, ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. ORCID: 0000-0001-9222-2935. E-mail: boykoniknik@gmail.com,

Жиликова Елена Теодоровна – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармацевтической технологии, ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. E-mail: ezhilyakova@bsu.edu.ru.

Малютин Анастасия Юрьевна – кандидат фармацевтических наук, без звания, доцент кафедры фармацевтической технологии, ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. ORCID: 0000-0001-6170-2151. E-mail: malyutina_a@bsu.edu.ru.

Наплеков Денис Константинович – аспирант 2-го года обучения кафедры фармацевтической технологии, ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. E-mail: 783767@bsu.edu.ru.

Шестопалова Наталья Николаевна – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, доцент кафедры фармацевтической технологии, ФГАОУ ВО НИУ «Бел-

ГУ» Минобрнауки России. E-mail: shestopalova@bsu.edu.ru.

Марцева Диана Сергеевна – аспирант 3-го года обучения кафедры фармацевтической технологии, ФГАОУ ВО НИУ «БелГУ» Минобрнауки России. E-mail: martseva@bsu.edu.ru.

Новиков Олег Олегович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий Центром коллективного пользования (научно-образовательный центр) «Центр контроля качества лекарств», ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов». ORCID: 0000-0003-3145-6783. E-mail: ole9222@yandex.ru

Писарев Дмитрий Иванович – доктор фармацевтических наук, доцент, Центр коллективного пользования (научно-образовательный центр) «Центр контроля качества лекарств», ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов». ORCID: 0000-0002-2996-7712. E-mail: juniper05@mail.ru

Мизина Пасковья Георгиевна – доктор фармацевтических наук, профессор, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений». ORCID: 0000-0001-6510-9603. E-mail: mizina-pg@yandex.ru

УДК 615.453.4.014.6



МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АЛЬГИНАТ-ХИТОЗАНОВЫХ МИКРОКАПСУЛ С ВИНПОЦЕТИНОМ

Ю.А. Полковникова¹, Н.А. Северинова¹, К.Н. Корянова², У.А. Тульская¹, М.В. Гречкина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», 394018 г. Воронеж, Университетская площадь, 1.

² Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, 357500, Россия, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11.

E-mail: juli-polk@mail.ru

Получено 25.09.2019

Рецензия (1) 10.10.2019

Рецензия (2) 15.10.2019

Принята к печати 21.10.2019

Цель: изучение морфологических, технологических и биофармацевтических свойств альгинат-хитозановых микрокапсул с винпоцетином.

Материалы и методы. Получены альгинат-хитозановые микрокапсулы с различной концентрацией натрия альгината (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% и 3%) и раствором хитозана средней вязкости (0,25–0,5%), а также микрокапсулы, не обработанные раствором хитозана. Исследования морфологии поверхности проводились методом атомно-силовой микроскопии с помощью сканирующего зондового микроскопа корпорации NT-MDT модели Solver P47 Pro. Для изучения биофармацевтических свойств микрокапсул использовался аппарат «Вращающаяся корзинка».

Результаты. Установлено, что микрокапсулы, не обработанные раствором хитозана, имеют гладкую, поперечно исчерченную поверхность с крупными высотами и глубокими впадинами. С увеличением концентрации натрия альгината поверхность становится более гладкой, пики – крупнее, выше и шире, впадины – глубже и более извилистыми. Микрокапсулы, обработанные раствором хитозана, напротив, имеют шероховатую поверхность, небольшие высоты и неглубокие впадины, и с увеличением концентрации натрия альгината поверхность становится более шероховатой, высоты равномерно распределяются в микрокапсуле. Методом спектрофотометрии определена эффективность микрокапсулирования и степень высвобождения винпоцетина из микрокапсул в единицу времени. При концентрации раствора натрия альгината 2,5% эффективность микрокапсулирования максимальна (86,8%). При данной концентрации происходит насыщение и при её дальнейшем увеличении эффективность снижается. Максимальная степень высвобождения винпоцетина наблюдается из образцов микрокапсул с концентрацией раствора натрия альгината 1% и составляет 41,17%.

Заключение. Амплитудные параметры поверхности микрокапсул имеют отличия при разных концентрациях. Существует закономерность чередования знака асимметрии и эксцесса у образцов с хитозаном. При изменении масштабов сканирования происходит изменение характеристик поверхности микрокапсул. Наиболее чётко отличительные детали структуры видны при масштабе 2×2 мкм². При концентрации натрия альгината 2,5% эффективность микрокапсулирования максимальна (86,8%). При изучении влияния концентрации раствора натрия альгината на степень высвобождения винпоцетина из образцов микрокапсул установлено, что при концентрации 1% степень высвобождения составляет 41,17%, а при 2,5–4,5%. Данные микрокапсулы можно использовать для изготовления капсул с модифицированным высвобождением.

Ключевые слова: альгинат натрия, хитозан, альгинат-хитозановые микрокапсулы, атомно-силовая микроскопия, амплитудные параметры, эффективность микрокапсулирования, степень высвобождения

Для цитирования: Ю.А. Полковникова, Н.А. Северинова, К.Н. Корянова, У.А. Тульская, М.В. Гречкина. Морфологические, технологические и биофармацевтические исследования альгинат-хитозановых микрокапсул с винпоцетином. *Фармация и фармакология*. 2019;7(5): 279-290. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-279-290

© Ю.А. Полковникова, Н.А. Северинова, К.Н. Корянова, У.А. Тульская, М.В. Гречкина, 2019

For citation: Morphological, technological and biopharmaceutical studies of alginate-chitosan microcapsules with vinpocetine. Yu.A. Polkovnikova, N.A. Severinova, K.N. Koryanova, U.A. Tulskaia, M.V. Grechkina. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(5): 279-290. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-279-290

MORPHOLOGICAL, TECHNOLOGICAL AND BIOPHARMACEUTICAL STUDIES OF ALGINATE-CHITOSAN MICROCAPSULES WITH VINPOCETINE

Yu.A. Polkovnikova¹, N.A. Severinova¹, K.N. Koryanova², U.A. Tul'skaya¹, M.V. Grechkina¹

¹ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Professional Education
"Voronezh State University", 1, Universitetskaya Sq., Voronezh, Russia 394006

² Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute of Volgograd Medical State University,
11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

E-mail: juli-polk@mail.ru

Received 25 September 2019

Review (1) 10 October 2019

Review (2) 15 October 2019

Accepted: 21 October 2019

The aim of the investigation is to study morphological, technological and biopharmaceutical properties of alginate-chitosan microcapsules with Vinpocetine.

Materials and Methods: Alginate-chitosan microcapsules with different concentrations of sodium alginate (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5% and 3%) and a medium viscosity chitosan solution (0.25–0.5%), as well as microcapsules not treated with a solution of chitosan, were obtained. The surface morphology was studied by methods of atomic-powered microscopy with the use of an NT-MDT Corporation probe scanning microscope (model Solver P47 Pro). To study biopharmaceutical properties of the obtained microcapsules, the "Rotating Basket" apparatus was used.

Results: It has been found out that the microcapsules not treated with a chitosan solution, have a smooth, transversely striated surface with large heights and deep cavities. With an increase in the concentration of sodium alginate, the surface becomes smoother, the peaks become larger, higher and wider, the cavities get deeper and more sinuous. The microcapsules treated with a chitosan solution, on the contrary, have a rough surface, low heights and shallow cavities, and with an increase in the concentration of sodium alginate, the surface becomes rougher, the heights are evenly distributed along the microcapsule. The spectrophotometry method was used to determine the efficiency of microencapsulation and the release rate of Vinpocetine from the microcapsules per unit time. When the concentration of a sodium alginate solution is 2.5%, the efficiency of microencapsulation is maximum (86.8%). At this concentration, saturation occurs and with its further increase, the efficiency decreases. The maximum release rate of Vinpocetine from microcapsule samples is observed when the concentration of a sodium alginate solution is 1%: it amounts to 41.17%.

Conclusion. The amplitude parameters of the microcapsules surface are different at different concentrations. There is a pattern of alternating signs of asymmetry and excess in the samples with chitosan. With a change in the scale of scanning, the surface characteristics of the microcapsules change. The most distinctive details of the structure are visible at the scale of $2 \times 2 \mu\text{m}^2$. At the concentration of sodium alginate of 2.5%, the efficiency of microencapsulation is maximum (86.8%). Studying the effect of the concentration of a sodium alginate solution on the release rate of Vinpocetine from the microcapsule samples has shown that at the concentration of 1%, the release rate is 41.17%, and at the concentration of 2.5% it is 4.5%. These microcapsules can be used in order to produce capsules with modified release.

Keywords: sodium alginate, chitosan, alginate-chitosan microcapsules, atomic-powered microscopy, amplitude parameters, microencapsulation efficiency, release rate

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы во всём мире всё большее значение придаётся использованию комплексов с хитином и хитозаном. Проводятся исследования их количественного и качественного анализа, а также получения этих полимеров, физико-химических свойств и возможности расширения применения хитина и хитозана в медицине [1]. Одним из наиболее перспективных и активно развивающихся направлений в фармации и фармакологии является разработка систем контролируемой доставки лекарственных средств [2, 3].

Также проводятся исследования по формированию плёночного покрытия на основе хитозана с включением антибиотиков [4].

Помимо исследований комплексов лекарственных веществ с хитозаном, научный интерес представляет использование хитозана в качестве лекарственного средства. В ходе изучения действия хитозана на модели контактного аллергического дерматита установлено, что хитозан способен снижать концентрацию металла в коже экспериментальных животных, при применении фотофореза. Эти результаты свидетельствуют об эффективности применения хитозана при лечении кожных заболеваний [5–8].

Хитозан – естественный поликатионник, линейный полисахарид, производный хитина. Является универсальным биоматериалом из-за отсутствия токсичности и хорошей биоразлагаемости и биосовместимости. Смеси моно-, поли- и олигомеров хитозана

высокой чистоты действуют как регенерирующие, ранозаживляющие и противоопухолевые препараты. Хитозан проявляет большой спектр положительных свойств, что даёт возможность использовать его в различных областях биомедицинской науки [9–13].

Использование хитозана в качестве наноносителя лекарственных средств является перспективным направлением науки, так как комплексы хитозан–лекарство обладают большей устойчивостью к разрушению под действием внутренней среды организма, а также повышают доставку лекарственного средства к мишени в неизменном виде.

В качестве оболочки часто используется водорастворимый и биodeградируемый полимер – альгинат натрия [14]. Альгинат натрия в качестве полимера для микрокапсул имеет широкое применение. В одном из исследований использовался альгинат натрия в виде 2% раствора для получения микрокапсул с бактериофагом. Получена инновационная кишечнорастворимая лекарственная форма, которая может применяться в качестве антибактериального препарата [15–17].

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) является одним из самых современных методов исследования свойств поверхности. Традиционно этот метод применяется для определения поверхностной морфологии различных объектов с высоким пространственным разрешением. Изучение шероховатости микрокапсул проводится с той целью, что истинная площадь поверхности чаще всего больше геометрической, так как структура микрорельефа влияют на неё. Обработка данных о рельефе поверхности даёт возможность глубокого анализа различных ее характеристик [18–20].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведение морфологических, технологических и биофармацевтических исследований альгинат-хитозановых микрокапсул с винпоцетином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования выбраны альгинат-хитозановые микрокапсулы с различной концентрацией натрия альгината (0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5% и 3%) и раствором хитозана средней вязкости (0,25–0,5%), а также микрокапсулы, не обработанные раствором хитозана. Получение образцов микрокапсул осуществлялось методом экструзии.

Исследования морфологии поверхности проводились методом АСМ с помощью сканирующего зондового микроскопа корпорации NT-MDT модели Solver P47 Pro (Россия, г. Зеленоград).

Сканирование осуществляли кантилеверами типа HA_NC (для микрокапсул без хитозана с концентрацией натрия альгината 0,5% и 1%), HA_FM (для микрокапсул без хитозана с концентрацией натрия альгината 2% и 3%) и NSG03 (для микрокапсул без

хитозана с концентрацией натрия альгината 1,5% и 2,5% и для микрокапсул с хитозаном со всеми используемыми концентрациями натрия альгината). Длинной 90 ± 5 мкм, резонансной частотой $(260 \div 630)$ кГц и радиусом кривизны острия зонда 10 нм. Эксперименты проводили на воздухе при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Поля сканирования достигали (5×5) мкм² при перепаде высот рельефа не более 2,5 мкм. С помощью зонда и сканера атомно-силового микроскопа удалось получить изображения поверхности с латеральным разрешением до 10 нм и вертикальным до 1 нм.

Визуализация результатов измерений состояла в представлении рельефа в виде трехмерных изображений. Обработка полученных АСМ-изображений осуществлялась с помощью ПО ACM Solver P47 Pro Nova RC1 и заключалась в анализе амплитудных среднестатистических параметров шероховатости поверхности в соответствии с международными стандартами:

R_a – средняя арифметическая шероховатость;

R_q – средняя квадратичная шероховатость;

R_z – максимальная высота профиля;

R_{sk} – асимметрия;

R_{ku} – эксцесс.

Обработку полученных АСМ-изображений для определения истинной и геометрической площадей поверхности микрокапсул проводили с помощью ПО Gwyddion 2.11.

Эффективность микрокапсулирования определяли «прямым» методом. Для прямого определения рассчитывалось фактическое содержание винпоцетина в микрокапсулах после микрокапсулирования. Для этого навеску микрокапсул растворяли в 0,01 М HCl, нагревали в течение 20 минут, затем охлаждали и доводили объём той же кислотой до метки. Методом спектрофотометрии определяли оптическую плотность полученного раствора в максимуме поглощения 312 нм. После определения количества выделившегося при растворении винпоцетина, зная его исходную концентрацию, рассчитывали эффективность микрокапсулирования с учетом количества включенного в микрокапсулы вещества $m_{\text{капс}}$, исходным количеством вещества, которое подвергалось растворению $m_{\text{исх}}$ согласно формуле:

$$\Xi = m_{\text{капс}} / m_{\text{исх}} * 100\% \quad (1)$$

Изучение биофармацевтических свойств проводилось в соответствии с ОФС 1.4.2.0014.15. Методом спектрофотометрии определялась оптическая плотность полученных растворов на каждом этапе отбора проб при максимуме поглощения 314 ± 2 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Микрокапсулы представляют собой непрозрачные, желтовато-белые или жёлтые среднетяжёлые крупные изодиаметрические (равноосные) кристаллы, обладающие хорошей сыпучестью, что является

основанием для использования их при изготовлении капсул.

Сравнение поверхности микрокапсул и их микропрофили с различной концентрацией натрия альгината, обработанных раствором хитозана и без обработки, представлено на рис. 1–6.

На рис. 1а поверхность имеет характерную продольную исчерченность, выступы и впадины различной высоты и глубины, соответственно. Структура гомогенная, видимых включений нет, наружная поверхность гладкая. На рис. 1б поверхность ячеистая, морщинистая, шероховатая. Имеются небольшие выступы. На микропрофиле с хитозаном (рис. 1в) виден выраженный рельеф поверхности с волнообразной поверхностью, пики сглажены. Микропрофиль без хитозана отсутствует, так как поверхность не имеет каких-либо характерных особенностей рельефа.

На рис. 2а поверхность слегка шероховатая, имеет редкую продольную исчерченность, глубокие впадины и пологие морщинистые высоты. На рис. 2б микрокапсулы имеют поперечно морщинистую структуру. Поверхность гладкая, присутствуют глубокие впадины, углубления и объёмные заострённые выступы. Микропрофили поверхности схожи. Оба имеют резкие разбросы в максимумах и минимумах высот. Пики слегка пильчатые. Видимые отличия в структуре рельефа практически отсутствуют.

На рис. 3а поверхность сильно шероховатая, с выступами различной высоты и ширины. Углубления и впадины небольшие. На вершинах высот имеются редкие мелкие шаровидные включения. На подъёмах и спусках поверхность продольно морщинистая. На рис. 3б поверхность гладкая, местами имеет продольную исчерченность. Встречаются одиночные каменистые и шарообразные включения разных размеров, а также группы таких включений. Углубления практически отсутствуют, но имеются небольшие выступы и подъёмы. Микропрофиль поверхности с хитозаном (рис. 3в) имеет менее сглаженную поверхность, но

меньшие перепады высот, а также пильчатые верхушки пиков, чем микропрофиль без хитозана (рис. 3г).

На рис. 4а поверхность слегка шероховатая, имеются характерные, встречающиеся группами, высокие пики с широким основанием и заострённой верхушкой. Впадины неглубокие, но протяжённые. На рис. 4б поверхность неровная, шероховатая, с многочисленными шаровидными выступами и включениями. Микропрофиль микрокапсул с хитозаном (рис. 4в) имеет скачкообразный рельеф, что значительно отличается от микропрофиля без хитозана (рис. 4г) с пилообразной поверхностью. При данной концентрации натрия альгината начинают проявляться различия в поверхности микрокапсул с хитозаном и без него.

На рис. 5а поверхность морщинистая, слабо ячеистая, видимые включения отсутствуют. На рис. 5б поверхность микрокапсулы гладкая, с длинными, извилистыми, неглубокими впадинами. Выступы крупные, пологие, со слабой поперечной исчерченностью. Включения отсутствуют. Микропрофили (рис. 5в и 5г) имеют характерные отличия. Поверхность с хитозаном имеет крупнозубчатый профиль с узкими и мелкопильчатыми пиками, а без хитозана наоборот, более ровная и сглаженная, а также имеет волнообразный сглаженный вид. Амплитудные параметры профиля для образцов (см. табл. 1) сильно разнятся по отношению друг к другу, что позволяет судить об отличиях микрокапсул с хитозаном и без него.

На рис. 6а микрокапсула сильно морщинистая, покрыта неглубокими многочисленными впадинами. Поверхность неравномерно шероховатая. Имеются пологие высоты различной формы. На рис. 6б поверхность микрокапсулы гладкая, глубоко извилистая, выступы крупные, пологие, поперечно исчерченные. Включения отсутствуют. На рис. 6в микропрофиль имеет крупнозубчатый вид с вытянутыми пильчатыми пиками. Микропрофиль без хитозана волнообразный, сглаженный.

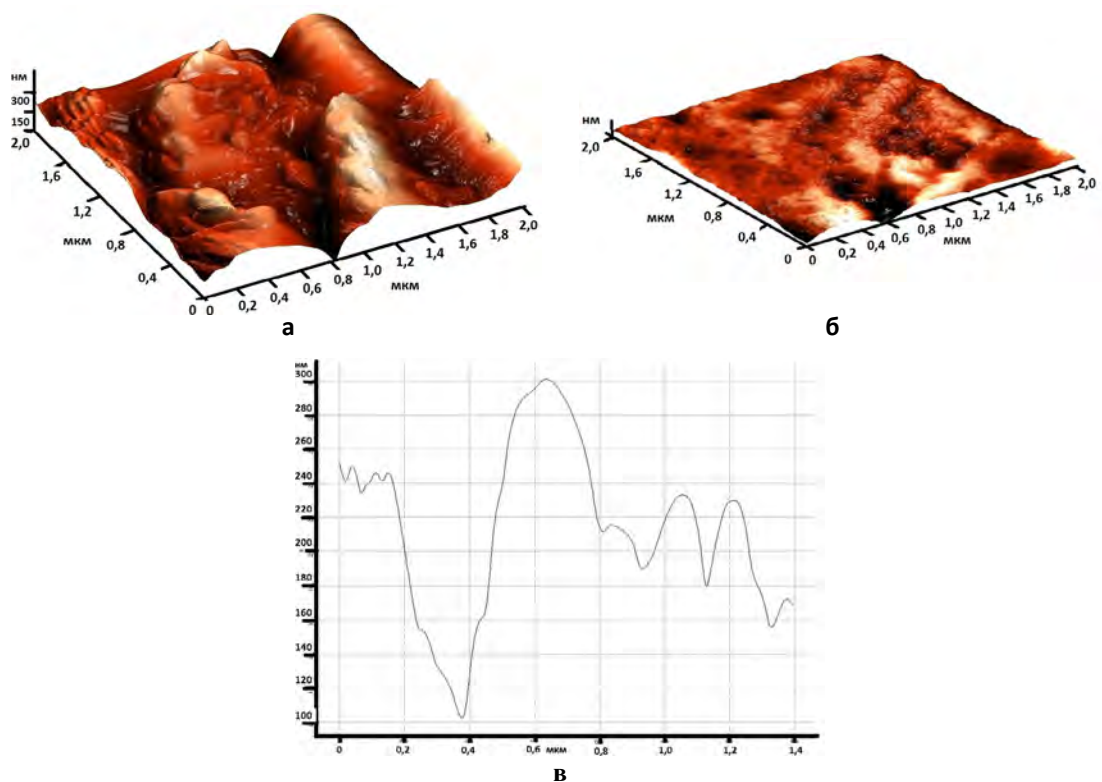


Рисунок 1 – Трёхмерное АСМ-изображение поверхности микрокапсул с концентрацией натрия альгината 0,5%, обработанных раствором хитозана (а) и его микропрофиль (в) и без хитозана (б) при площади сканирования 2×2 мкм²

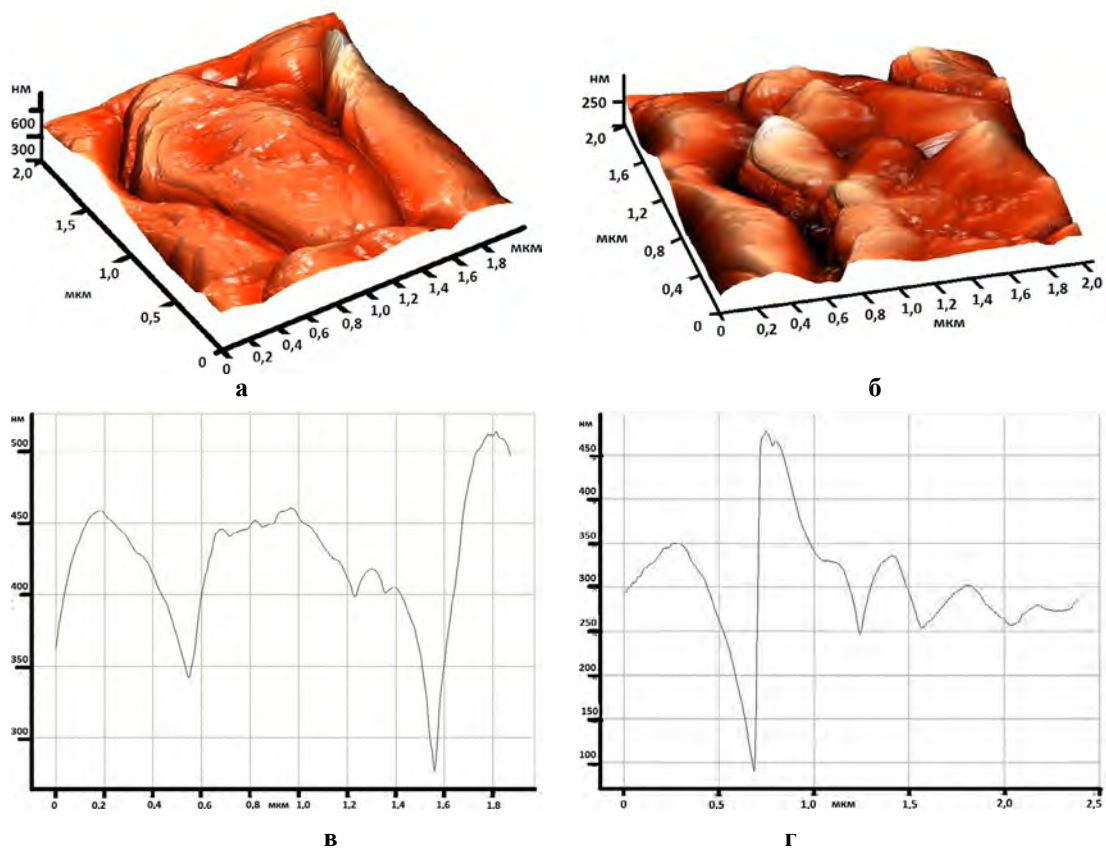


Рисунок 2 – Трёхмерное АСМ-изображение поверхности микрокапсул с концентрацией натрия альгината 1%, обработанных раствором хитозана (а) и без хитозана (б) и их микропрофили (в и г) при площади сканирования 2×2 мкм²

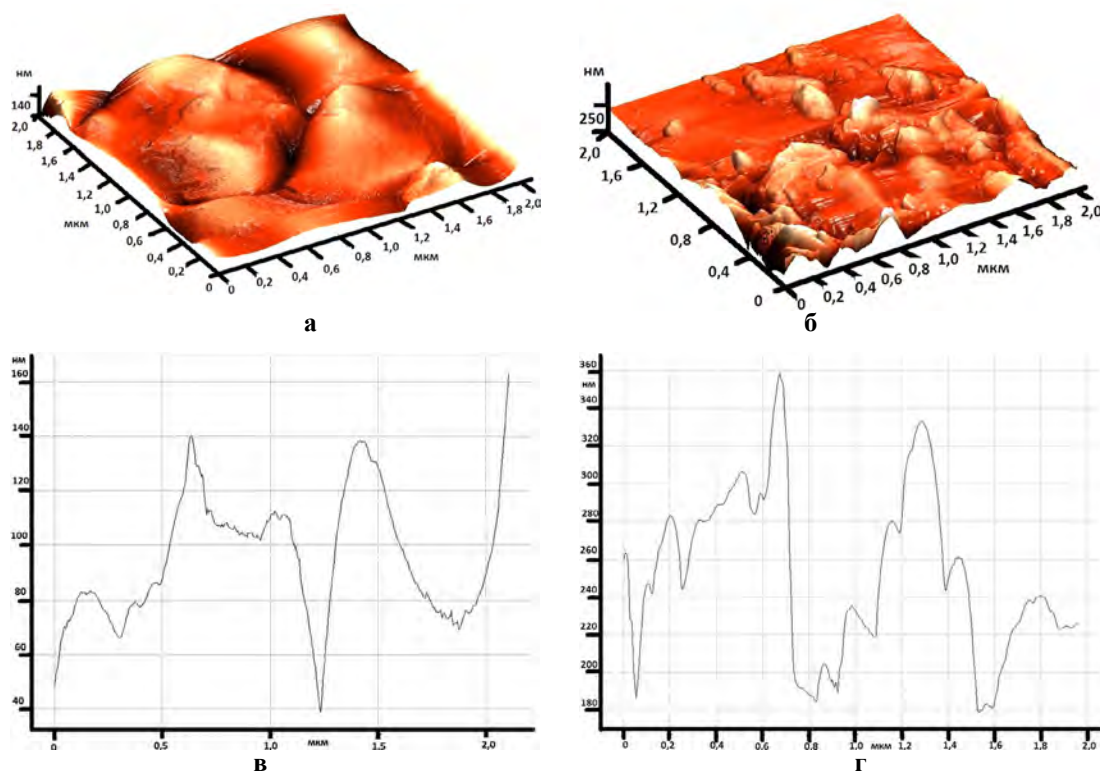


Рисунок 3 – Трёхмерное АСМ-изображение поверхности микрокапсул с концентрацией натрия альгината 1,5%, обработанных раствором хитозана (а) и без хитозана (б) и их микропрофили (в и г) при площади сканирования 2×2 мкм²

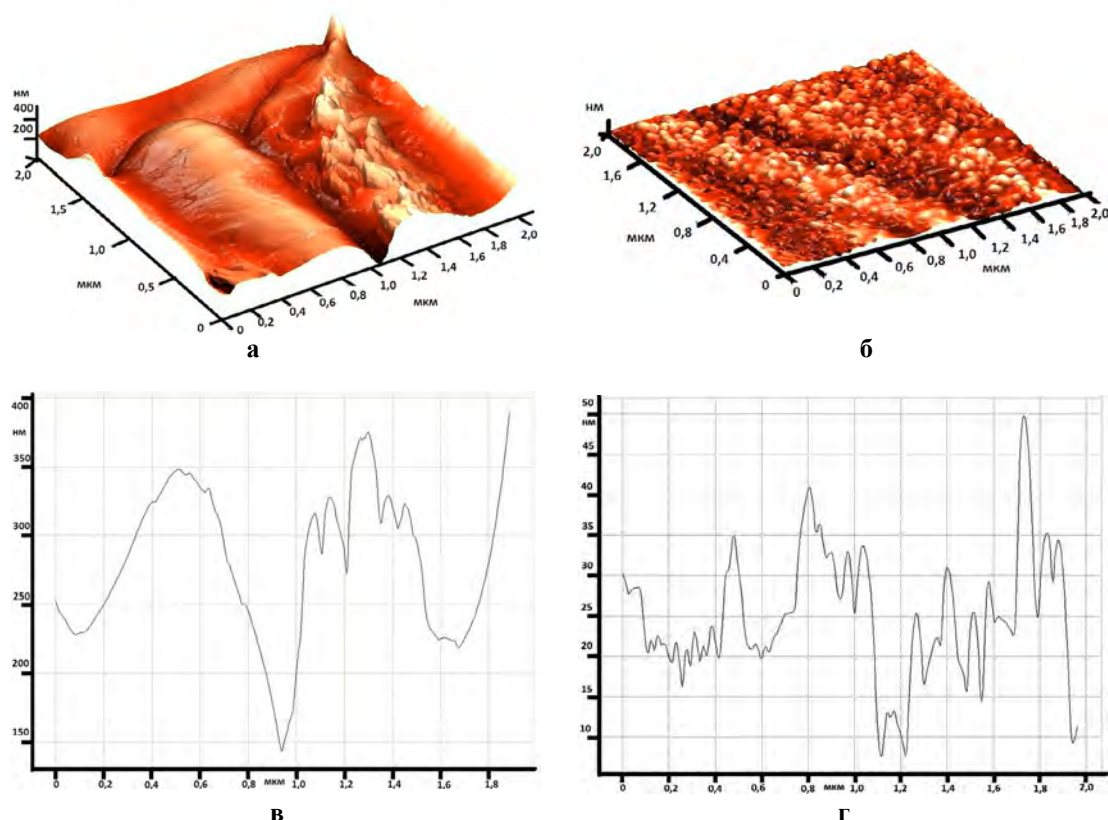


Рисунок 4 – Трёхмерное АСМ-изображение поверхности микрокапсул с концентрацией натрия альгината 2%, обработанных раствором хитозана (а) и без хитозана (б) и их микропрофили (в и г) при площади сканирования 2×2 мкм²

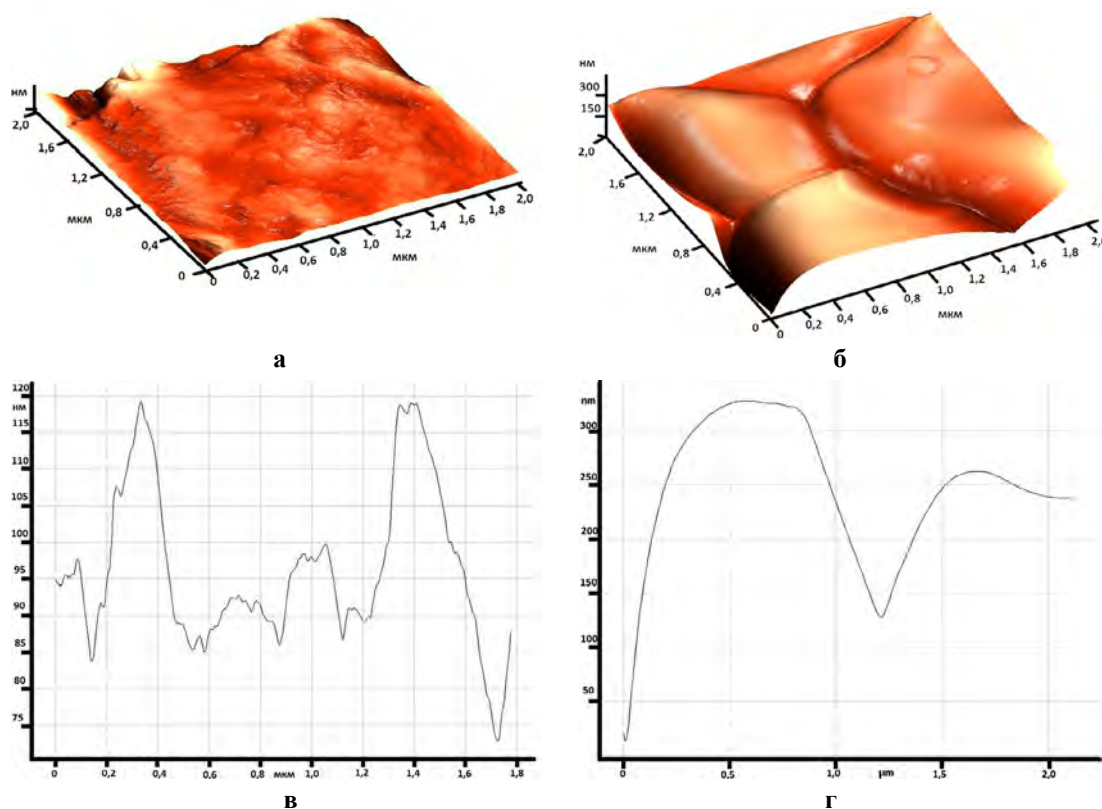


Рисунок 5 – Трёхмерное АСМ-изображение поверхности микрокапсул с концентрацией натрия альгината 2,5%, обработанных раствором хитозана (а) и без хитозана (б) и их микропрофили (в и г) при площади сканирования $2 \times 2 \text{ мкм}^2$

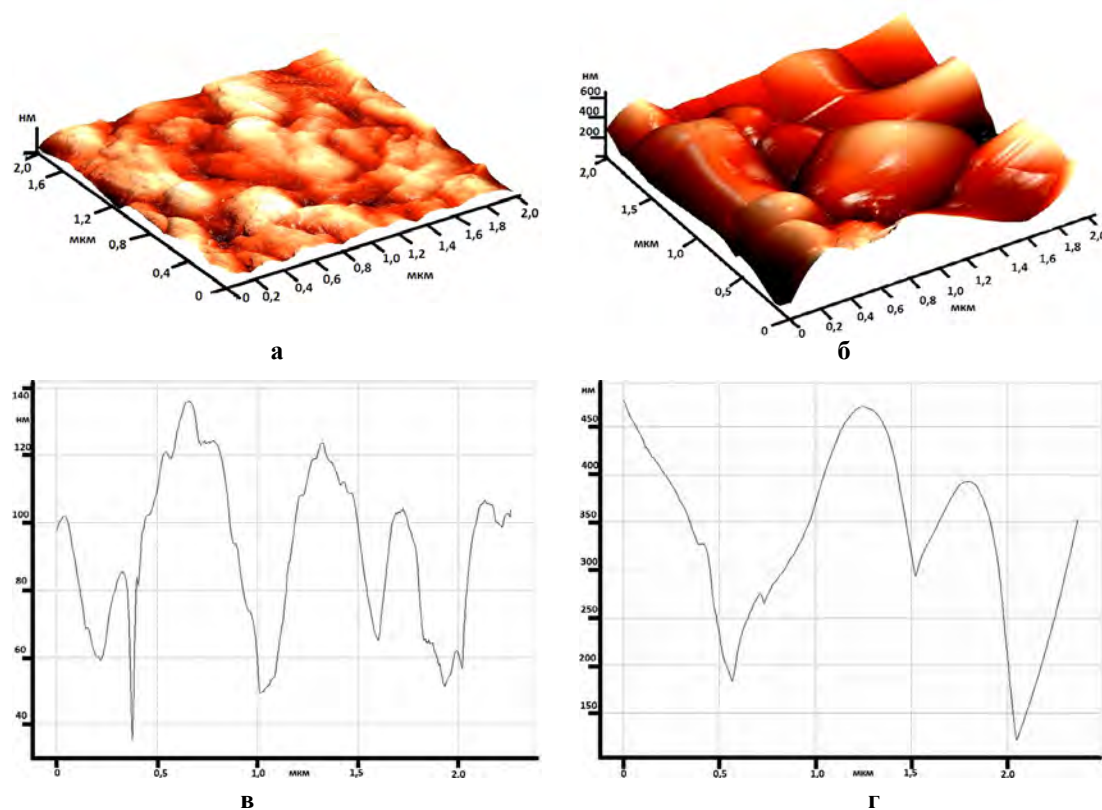


Рисунок 6 – Трёхмерное АСМ-изображение поверхности микрокапсул с концентрацией натрия альгината 3%, обработанных раствором хитозана (а) и без хитозана (б) и их микропрофили (в и г) при площади сканирования $2 \times 2 \text{ мкм}^2$

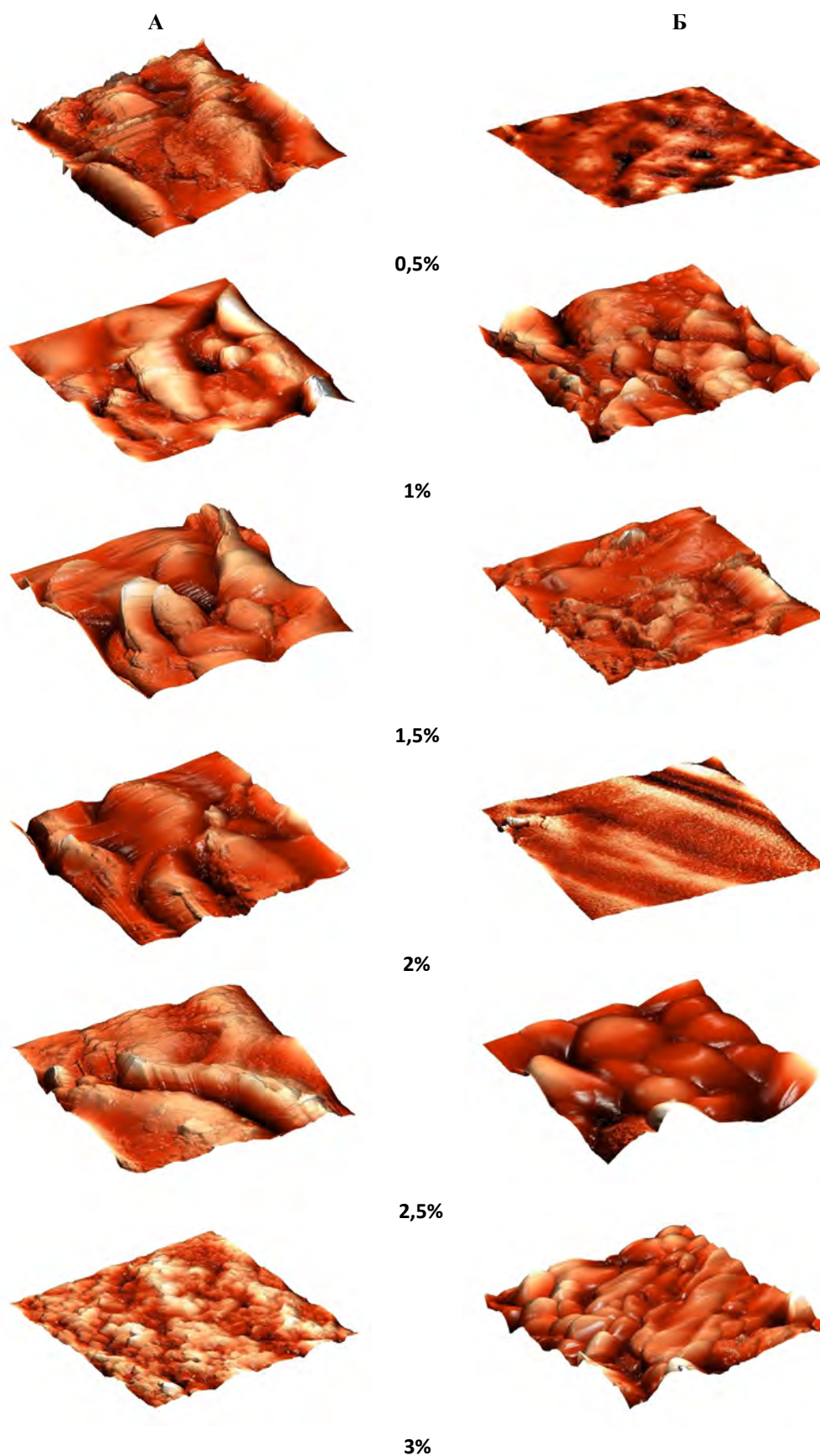


Рисунок 7 – Трёхмерные АСМ-изображения поверхности микрокапсул с различными концентрациями натрия альгината, обработанных раствором хитозана (А) и без хитозана (Б) при площади сканирования 5×5 мкм²

Таблица 1 – Параметры шероховатости поверхности микропрофиля при площади сканирования 2×2 мкм²

Концентрация раствора натрия альгината	Вид микрокапсул	R _z , нм	R _a , нм	R _q , нм	R _{sk} , нм	R _{ku} , нм
0,5%	С хитозаном	199	41,8	51,4	-0,3	-0,5
	Без хитозана	–	–	–	–	–
1%	С хитозаном	240	31,9	46,7	-1,5	3,6
	Без хитозана	390	49,2	73,5	0,1	2,6
1,5%	С хитозаном	126	19,4	23,9	0,3	1,2
	Без хитозана	180	39,4	48,4	0,6	-0,4
2%	С хитозаном	232	47,0	56,0	-0,4	-0,3
	Без хитозана	42	6,3	8,2	0,5	0,6
2,5%	С хитозаном	46,5	8,3	10,8	0,8	0,1
	Без хитозана	314	57,4	85,9	-1,5	2,4
3%	С хитозаном	101	24,8	27,2	-0,2	-1,4
	Без хитозана	680	77,8	95,8	-0,2	-0,6

На основании микропрофилей проведены вычисления амплитудных параметров шероховатости. Результаты приведены в табл. 1.

На основе проведённых исследований, установлено, что, микрокапсулы, не обработанные раствором хитозана, имеют гладкую, поперечно исчерченную поверхность с крупными высотами и глубокими впадинами. С увеличением концентрации натрия альгината поверхность становится более гладкой, пики – крупнее, выше и шире, впадины – глубже и более извилистыми. Микрокапсулы, обработанные раствором хитозана, напротив, имеют шероховатую поверхность, небольшие высоты и неглубокие впадины, и с увеличением концентрации натрия альгината поверхность становится более шероховатой, высоты равномерно распределяются микрокапсуле. При концентрации натрия альгината 0,5%, 1% и 1,5% отличия между микрокапсулами с хитозаном и без хитозана незначительны, но при концентрациях 2,0%, 2,5% и 3% характерные особенности становятся чёткими. Микропрофили позволили рассчитать необходимые параметры шероховатости. Вычисленные данные подтвердили различия в характере поверхности микрокапсул. Для образцов с хитозаном и концентрацией натрия альгината 0,5%, 1%, 2% и 3% характерна отрицательная асимметрия, что свидетельствует о том, что распределение имеет длинный левый «хвост», и отрицательный эксцесс (кроме образца с 1%). Микрокапсулы без хитозана с концентрацией натрия альгината 1–2% имеют положительную асимметрию с близкими показателями, т.е. длинный правый «хвост». Образцы с хитозаном и без хитозана при концентрации 1,5% имеют разную положительную асимметрию при разных эксцессах, а при концентрации 3% – одинаковую отрицательную асимметрию с разными, но отрица-

тельными эксцессами. Наблюдается некоторое чередование знака асимметрии и эксцесса у образцов с увеличением концентрации.

На рис. 7 представлены поверхности микрокапсул с различной концентрацией натрия альгината, обработанных раствором хитозана и без обработки при площади сканирования 5×5 мкм².

При площади сканирования 5×5 мкм² также можно наблюдать проявление различий в структуре поверхности микрокапсул с хитозаном и без хитозана, но чётко видные отличия заметны только при концентрации натрия альгината 2,5% и 3%. При концентрации 2% наблюдаются слабо различимые характерные признаки. Также при данной площади сканирования, описанные выше характерные признаки и структурные особенности поверхности микрокапсул при различной концентрации натрия альгината, менее заметны, вследствие чего при концентрации 2% трудно отличить микрокапсулы с хитозаном и без него.

На следующем этапе исследований методом спектрофотометрии была определена эффективность микрокапсулирования. На основе полученных данных построен график зависимости эффективности микрокапсулирования винпоцетина от концентрации натрия альгината (рис. 8.).

Так, при концентрации натрия альгината 2,5% эффективность микрокапсулирования максимальна и составляет 86,8%. При данной концентрации происходит насыщение, и при её дальнейшем увеличении эффективность снижается.

В результате проведенных биофармацевтических исследований показано влияние на высвобождение винпоцетина концентрации раствора натрия альгината, используемой при получении микрокапсул (рис. 9).

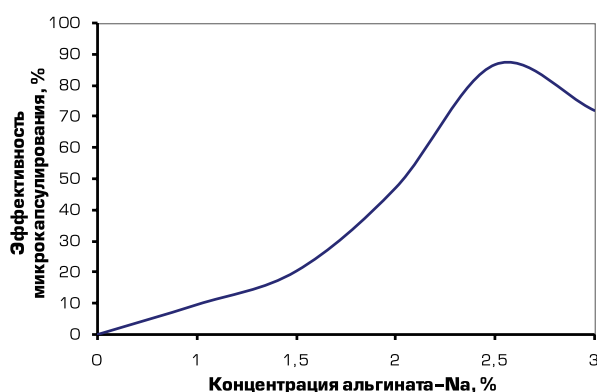


Рисунок 8 – Зависимость эффективности микрокапсулирования от концентрации натрия альгината

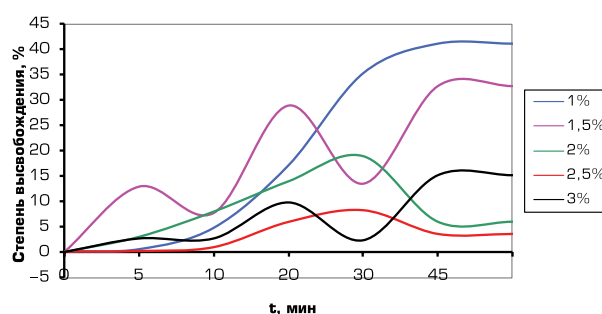


Рисунок 9 – Степень высвобождения винпоцетина из микрокапсул

Таблица 2 – Технологические свойства микрокапсул

Исследуемый показатель	Методика определения	Значения, полученные экспериментальным путем	Референтные значения
Размер микрокапсул	<u>ОФС.1.1.0015.15</u>	1,0–2,0 мм 0,5–1,0 мм 0,2–0,5 мм (Среднемелкие, крупные и очень крупные)	Очень крупные: >1,4 мм Крупные: 0,355–1,4 мм Среднемелкие: 0,18–0,355 мм Мелкие: 0,125–0,18 мм Очень мелкие: 0,09–0,125 мм
Форма микрокапсул	<u>ОФС.1.2.1.0009.15</u>	Равноосная	Удлиненная: >3:1 Пластинчатая: 3:1 Равноосная: 1:1
Сыпучесть	<u>ОФС.1.4.2.0016.15</u>	Насыпная плотность 714,3 кг/м ³ (Средние)	Весьма тяжелые: >2000 кг/м ³ Тяжелые: 1100–2000 кг/м ³ Средние: 600–1100 кг/м ³ Легкие: < 600 кг/м ³
		Сыпучесть 14,17 г/с (Хорошая)	Отличная: 8,6–12,0 г/с Хорошая: 6,6–8,5 г/с Удовлетворительная: 3,0–6,5 г/с Допустимая: 2,0–3,0 г/с Плохая: 1,0–2,0 г/с Очень плохая: <1,0 г/с
		Угол естественного откоса 34° (Хорошая)	Очень хорошая: 25–30° Хорошая: 31–35° Удовлетворительная: 36–45° Неудовлетворительная: 46–55° Плохая: 56–65° Очень плохая: >66°

Степень высвобождения винпоцетина из образцов микрокапсул с концентрацией раствора натрия альгината 1% максимальна и составляет 41,17%. Из микрокапсул с 2,5% концентрацией раствора натрия альгината наблюдается более медленное высвобождение, к 45 минутам эксперимента составляет 4,5%.

Далее были изучены технологические свойства микрокапсул (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что микрокапсулы представляют собой непрозрачные, желтовато-белые или жёлтые среднемелкие, крупные и очень крупные изодиаметрические (равноосные) среднетяжёлые частицы, обладающие хорошей

сыпучестью, что позволяет использовать их в качестве наполнителя для капсулированных форм.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены модельные образцы микрокапсул винпоцетина. Методом атомно-силовой микроскопии проведено исследование морфологических особенностей альгинат-хитозановых микрокапсул. Обработанные хитозаном микрокапсулы имеют характерные отличия в структуре поверхности от микрокапсул без хитозана. Различия наиболее чётко проявляются при концентрации натрия альгината 2,5% и 3%. Амплитудные параметры имеют отличия при разных концентрациях. У образцов с хитозаном

преобладает отрицательная асимметрия (0,5%, 1%, 2%, 3%), эксцесс распределён равномерно. У образцов без хитозана преобладает положительная асимметрия (1%, 1,5%, 2%) и положительный эксцесс. Существует некая закономерность чередования знака асимметрии и эксцесса у образцов с хитозаном. При изменении масштабов сканирования происходит изменение характеристик поверхности микрокапсул. Наиболее чётко отличительные детали структуры видны при масштабе $2 \times 2 \text{ мкм}^2$.

При концентрации раствора натрия альгината 2,5% эффективность микрокапсулирования максимальна (86,8%).

При изучении влияния концентрации раствора натрия альгината на степень высвобождения винпоцетина из образцов микрокапсул установлено, что концентрации 1% степень высвобождения составляет 41,17%, а при 2,5–4,5%. Данные микрокапсулы

можно использовать для изготовления капсул с модифицированных высвобождением.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что с увеличением степени шероховатости микрокапсул происходит повышение эффективности микрокапсулирования. С увеличением концентрации раствора натрия альгината происходит снижение степени высвобождения вещества. Это может быть объяснено тем, что винпоцетин обладает сродством к натрию альгинату, который связывает его в комплекс, и с повышением концентрации раствора натрия альгината в водной среде прочность связывания возрастает.

Полученные при исследовании результаты перспективны для дальнейшего детального изучения микрокапсулированного винпоцетина с целью создания его лекарственных форм.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-315-50008.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Li J., Zhang J.J., Zhao X.J. Preparation of porcine hemoglobin microcapsules of chitosan-sodium alginate // *Frontiers of Chemistry in China*. – 2007. – Vol. 2, №3. – P. 315–317.
- El-Gibaly I. Development and in vitro evaluation of novel floating chitosan microcapsules for oral use: comparison with non-floating chitosan microspheres // *Int J Pharm*. – 2002. – Vol. 249, № 1–2. – P. 7–21.
- Goh C.H., Heng P.W.S., Chan L.W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications // *Carbohydr Polym*. – 2012. – Vol. 88. – P. 1–12.
- Xu J., Li S., Tan J., Luo G. Controllable preparation of monodispersed calcium alginate microbeads in a novel microfluidic system // *Chem Eng Technol*. – 2008. – Vol. 31. – P. 1223–1226.
- Lin W.C., Yu D.G., Yang M.C. pH-Sensitive polyelectrolyte complex gel microspheres composed of chitosan/sodium tripolyphosphate/dextran sulfate: swelling kinetics and drug delivery properties // *Colloid Surface B: Biointerfaces*. – 2005. – Vol. 19544, №2–3. – P. 143–151.
- Полковникова Ю.А. Разработка методов исследования винпоцетина в микрокапсулах // *Успехи современного естествознания*. – 2014. – №4. – С. 75–78.
- Солодовник В.Д. Микрокапсулирование. – М: Химия, 1980. – 216 с.
- Mano J.F. Stimuli-responsive polymeric systems for biomedical applications // *Adv Eng Mater*. – 2008. – Vol. 10. – P. 515–27.
- Белова С.В., Бабушкина И.В., Гладкова Е.В., Мамонова И.А., Карякина Е.В., Коршунов Г.В. Регенерация экспериментальной гнойной раны и процессы свободнорадикального окисления при использовании наночастиц металлов и хитозана // *Дальневосточный медицинский журнал*. – 2014. – №3. – С. 79–82.
- Tzi Bun Ng, Jack Ho Wong, Wai Yee Chan Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications // *Mar. Drugs* – 2015. – Vol. 13, №8. – P. 5156–5186.
- Islam S., Rahman Bhuiyan M.A., Islam M.N. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering // *Journal of Polymers and the Environment*. – 2017. – Vol. 25. – P. 854–866.
- Agnihotri S.A., Aminabhavi T.M. Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method // *Journal of Controlled Release*. – 2004. – Vol. 96, № 2. – P. 245–259.
- Chan E.S., Wong S.L., Lee P.P., Lee J.S., Ti T.B., Zhang Z., Poncelet D., Ravindra P., Phan S.H., Yim ZH. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells // *Carbohydr. Polym*. – 2011. – Vol. 83, №1. – P. 225–232.
- Бровко О.С., Паламарчук И.А., Вальчук Н.А., Бойцова Т.А., Боголицын К.Г., Чухчин Д.Г. Структура интерполимерных комплексов на основе натрия альгината и хитозана // *Известия Уфимского научного центра Российской академии наук*. – 2016. – №3–1. – С. 19–22.
- Fuentsanta M., Grau A., Romero-Sánchez M.D. Effect of the polymer shell in imidazole microencapsulation by solvent evaporation method // *Polym. Bull*. – 2013. – Vol. 70. – P. 3055
- Polkovnikova Y.A., Glushko A.A. Selection of filmproofers in microcapsulation of vinpocetin // *Pharmacy &*

- Pharmacology. – 2018. – 6(2). – 197–210. (In Russ.) DOI:10.19163/2307-9266-2018-6-2-197-210.
17. Hojjati M., Razavi S.H., Rezaei K. Spray drying microencapsulation of natural canthaxanthin using soluble soybean polysaccharide as a carrier // Food Sci Biotechnol. – 2011. – Vol. 20. – P. 63.
18. Трасатти С. Петрий О.А. Измерения истинной площади поверхности в электрохимии / С. Трасатти, // Электрохимия. – 1993. Т. 29, №4. – С. 557–575.
19. Дьяконова О.В., Соколова С.А., Зяблов А.Н., Жиброва Ю.А. Исследование состояния поверхности мембранных материалов методом сканирующей зондовой микроскопии // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8, № 5. – С. 863–868.
20. ГОСТ 25142-82. Шероховатость поверхности. Термины и определения. Москва, Государственный комитет СССР по стандартам. 1982, 22 с.

АВТОРЫ

Полковникова Юлия Александровна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии и фармацевтической химии фармацевтического факультета, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия; ORCID: 0000-0003-0123-9526. E-mail: juli-polk@mail.ru.

Северинова Наталья Александровна – студентка 4 курса фармацевтического факультета. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия; ORCID: 0000-0002-3507-5665. E-mail: natali-sewer@yandex.ru

Корянова Ксения Николаевна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии. Пятигорский медико-фармацев-

тический институт – филиал ФГБОУ ВО Волгоградский государственный медицинский университет, Пятигорск, Россия; ORCID: 0000-0003-1571-9301. E-mail: kskor-16@mail.ru

Тульская Ульяна Анатольевна – соискатель кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии фармацевтического факультета. Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия; ORCID: 0000-0001-5775-9884. E-mail: tulskaia1994@mail.ru

Гречкина Маргарита Владимировна – ведущий инженер кафедры физики полупроводников и микроэлектроники, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия; ORCID: 0000-0002-7873-8625, тел.: +7(473) 2208481. E-mail: grechkina_m@mail.ru

УДК 616.89-008.441.13-099-092.4:547.434.2



КОРРЕКЦИЯ ПСИХОНЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ АЛКОГОЛЬНОГО ПОХМЕЛЬЯ У КРЫС АЦЕТИЛЦИСТЕИНОМ

Д.В. Куркин, Е.И. Морковин, Н.А. Осадченко, Л.П. Кнышова,
Д.А. Бакулин, Е.Е. Абросимова, Ю.В. Горбунова, И.Н. Тюренков

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

E-mail: strannik986@mail.ru

Получено 30.09.2019

Рецензия (1) 17.10.2019

Рецензия (2) 21.10.2019

Принята к печати 25.10.2019

Разработка средств для устранения алкогольного похмелья важна для большого числа людей, в том числе связанных с выполнением ответственных и опасных видов работ. Тяжесть похмельного синдрома определяется токсическим действием ацетальдегида и скоростью его метаболизма, которая снижается при истощении запасов глутатиона, что приводит к утяжелению и пролонгации похмелья.

Цель. Экспериментальное обоснование применения ацетилцистеина в качестве предшественника глутатиона для снижения выраженности психоневрологических и когнитивных нарушений, возникающих на фоне алкогольной интоксикации.

Материалы и методы. Исследование проведено на крысах-самцах линии Wistar. Состояние «похмелья» моделировали путем однократного введения этанола (3 г/кг, в/б). После пробуждения животных разделяли на 2 группы: опытной группе однократно перорально вводили раствор ацетилцистеина (1 мг/кг), контрольной группе – физ. р-р. Интактной группе вводили физ. р-р. До лечения и спустя 3 часа поочередно оценивали уровень неврологического дефицита по шкале «Combs and D'Alecy», а также проводили тесты: Адгезивный тест, Открытое поле (ОП), УРПИ и лабиринт Морриса. После эвтаназии определяли уровень глутатиона в гомогенатах печени.

Результаты. У животных контрольной группы отмечались выраженные признаки психоневрологических и когнитивных нарушений, проявляющихся в низкой двигательной активности, нарушении мелкой моторики и когнитивных функций.

У животных, которым вводили ацетилцистеин, нарушения психоневрологических и когнитивной функций были менее выражены, что проявлялось в улучшении мелкой моторики в Адгезивном тесте, повышении двигательной активности в тесте ОП. В тестах лабиринт Морриса и УРПИ, в которых оценивают сохранность памятного следа, большее количество животных успешно решили задачу, а уровень глутатиона в печени отвечал физиологической норме.

Заключение. На фоне острой алкогольной интоксикации введение ацетилцистеина, способствует восстановлению содержания глутатиона в печени и приводит к снижению выраженности нарушений психоневрологических и когнитивной функций у экспериментальных животных.

Ключевые слова: этанол, постинтоксикационное состояние, похмелье, ацетилцистеин, крысы, доклинические исследования

Список сокращений: АТФ – аденозинтрифосфат; АЦЦ – ацетилцистеин; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; НАД – никотинамидадениндинуклеотид; ОП – Открытое поле; УРПИ – условная реакция пассивного избегания.

Для цитирования: Д.В. Куркин, Е.И. Морковин, Н.А. Осадченко, Л.П. Кнышова, Д.А. Бакулин, Е.Е. Абросимова, Ю.В. Горбунова, И.Н. Тюренков. Коррекция психоневрологических проявлений алкогольного похмелья у крыс ацетилцистеином. *Фармация и фармакология*. 2019;7(5):291-299. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-291-299

© Д.В. Куркин, Е.И. Морковин, Н.А. Осадченко, Л.П. Кнышова, Д.А. Бакулин, Е.Е. Абросимова, Ю.В. Горбунова, И.Н. Тюренков, 2019

For citation: D.V. Kurkin, E.I. Morkovin, N.A. Osadchenko, L.P. Knyshova, D.A. Bakulin, E.E. Abrosimova, Yu.V. Gorbunova, I.N. Tyurenkov. Correction of psychological and neurological signs of alcohol hangover in rats with acetylcysteine. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(5):291-299. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-291-299

CORRECTION OF PSYCHOLOGICAL AND NEUROLOGICAL SIGNS OF ALCOHOL HANGOVER IN RATS WITH ACETYLCYSTEINE

D.V. Kurkin, E.I. Morkovin, N.A. Osadchenko, L.P. Knyshova,
D.A. Bakulin, E.E. Abrosimova, Yu.V. Gorbunova, I.N. Tyurenkov

Volgograd State Medical University
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russian Federation, 400131

E-mail: strannik986@mail.ru

Received 30 September 2019

Review (1) 17 October 2019

Review (2) 21 October 2019

Accepted: 25 October 2019

The development of medications to treat alcohol hangover is important for a large number of people, especially those, who perform responsible and dangerous types of work. The severity of the hangover syndrome is determined by the toxic effect of acetaldehyde and its metabolic rate, which decreases with the depletion of glutathione, worsening and prolonging the hangover.

The aim of the article is to provide an experimental basis for use of acetylcysteine as a precursor of glutathione in treatment of psychological, neurological and cognitive symptoms of ethanol hangover.

Materials and methods. The study was performed in male Wistar rats. The ethanol hangover was modeled via an acute ethanol injection (i.p., 3 g/kg). After awakening, the animals were divided into 2 groups, receiving acetylcysteine (p.o., 1 mg/kg) or saline. The intact group of the animals received saline only. Before and after acetylcysteine or saline administration, the animals were assessed according to Combs and D'Alecy scale. The adhesive test, the open field test, the passive avoidance test and Morris water maze test were also performed twice. The liver glutathione level was assessed in sacrificed animals.

Results. The control group animals showed signs of neurological deficits and cognitive impairment, including a decreased locomotion, motor deficits and a memory decline. The rats administered with acetylcysteine after the ethanol intoxication, had a less severe impairment associated with an improved performance in the adhesive test, Morris water maze test and the passive avoidance test, and demonstrated an increased locomotion in the open field test. The liver glutathione content in the animals treated with acetylcysteine, was comparable to the glutathione content in the liver of the animals not exposed to the ethanol intoxication.

Conclusion. Against the background of an acute ethanol intoxication, an oral administration of acetylcysteine in the rats, promoted an increase in liver glutathione levels and led to a decrease in severity of neurological and cognitive deficits in the animals.

Keywords: ethanol, post-toxic state, hangover, acetylcysteine, rat, preclinical study

Abbreviations: ATP – adenosine triphosphate; WHO – World Health Organization; NAD – nicotinamide adenine dinucleotide; OP – Open field.

ВВЕДЕНИЕ

Острое употребление больших количеств этилового спирта влечет глубокие негативные социально-экономические последствия. По данным Центров по контролю и профилактике заболеваний США за 2010 г., экономические потери, обусловленные снижением производительности труда из-за употребления алкоголя, составили 179 миллиардов долларов. Несмотря на большие социально-экономические издержки и затраты медицинских служб на терапию похмельного синдрома и его последствий, эта проблема пользуется относительно небольшим интересом среди исследователей, в результате этот крайне распространённый симптомокомплекс в своём патогенезе до сих пор имеет много необъясненных аспектов. Для улучшения методов его профилактики или фармакотерапии, необходимо более глубокое понимание патологических процессов, которые протекают в организме при развитии подобного состояния [1,2].

В настоящее время этот синдром определяется как общий дискомфорт, возникающий после полного метаболизма ранее принятого алкоголя (т.е. в ситуации, когда алкоголь не может быть определён в крови). Психоневрологические нарушения, возникающие после употребления больших доз алкоголя, представляют собой не устойчивое состояние организма, а развивающийся и медленно угасающий процесс, что особенно важно учитывать людям, профессиональная деятельность которых требует внимания и скорости принятия решений с риском возникновения угрожающих ситуаций (например, водители и операторы сложных механизмов) [3]. Наличие похмелья стороннему человеку трудно обнаружить и отличить от симптомов некоторых заболеваний (головная боль напряжения, пищевое отравление, артериальная гипертензия), что при определенных условиях может представлять угрозу для окружающих. В частности, профессиональные водители, нахо-

дящиеся в состоянии посталкогольной интоксикации совершают значительно больше серьёзных ошибок при вождении в симуляционных условиях (на симуляторе автомобиля), чаще и на большую величину превышают скорость, игнорируют дорожные знаки и указатели, не замечают резко возникающие помехи, медленнее и/или неадекватно реагируют при возникновении аварийно-опасных ситуаций [4,5]. Важно отметить, что в подобном состоянии часто повышается раздражительность и агрессивность, что может быть связано с выраженным болевым синдромом и/или повышением уровня тестостерона, что было отмечено в некоторых исследованиях [6, 7], метаболизм которого происходит в печени и может изменяться с истощением внутриклеточных субстратов, вызванных поэтапным и интенсивным процессом биотрансформации, вначале алкоголя, а затем его метаболитов. Похмелье характеризуется развитием комплекса негативных симптомов наиболее распространёнными из которых являются: головная боль, тошнота, рвота, диарея, озноб, лихорадка, сонливость, тремор, раздражительность, агрессивность [8]. В коллективах, сотрудники которых на условиях анонимности сообщали о выполнении служебных обязанностей в состоянии на утро после употребления больших доз алкоголя, чаще возникали межличностные конфликты, а общая производительность труда была низкой [9].

Употребление этанола, это пример добровольного, в значительной степени бесконтрольного, применения самого распространённого и, вероятно, наиболее изученного психотропного средства [10]. При массе стрессогенных факторов современной жизни антидепрессанты, психостимулирующие, растормаживающие и гедонические эффекты этилового спирта часто становятся причиной злоупотребления. Хотя алкоголь часто употребляется в дозах, вызывающих похмелье, универсальные признаки, позволившие бы определить группу риска, отсутствуют. По этой причине негативные явления, связанные с его употреблением могут возникнуть у абсолютно любого человека (вне зависимости от его социального, финансового или правового статуса, ментального и физического уровня развития).

В соответствии с результатами некоторых социологических исследований, 75% людей, которые употребляли алкогольные напитки до состояния опьянения, пережили похмелье хотя бы один раз, 15% опрошенных отметили, что последний подобный эпизод у них был в предыдущем месяце. Около 50% лиц, постоянно употребляющих этанол (те, кто потребляет один или два напитка в день, один напиток – эквивалент по дозе 50 г чистого алкоголя [11]), имеют привычное похмелье. Среди людей, открыто сообщающих о факте частого употребления этилового спирта, 40% заявляют, что психоневрологические постинтоксикационные последствия у них возникают

ежемесячно или чаще. У больных алкоголизмом их распространённость ниже и составляет 20–25%. До 87% студентов университетов в течение года испытывают один или более эпизодов похмелья, при этом в многочисленных исследованиях доказано негативное влияние этого симптомокомплекса на когнитивную деятельность [12].

Фармакотерапия является единственным эффективным способом устранения последствий острого чрезмерного употребления алкогольных напитков, однако современный фармацевтический рынок располагает ограниченным количеством лекарственных препаратов для профилактики и лечения данного состояния [13]. Ситуация осложняется не только отсутствием согласованных мнений профессионального сообщества относительно патогенеза похмелья, но и трудностями, возникающими при инициации и проведении доклинических исследований.

Одним из перспективных направлений в терапии похмелья является разработка средств, ускоряющих метаболизм ацетальдегида. Среди соединений, обладающих подобным действием, можно выделить ацетилцистеин, который является предшественником глутатиона, важнейшего регулятора окислительно-восстановительных процессов в клетках, в том числе и в гепатоцитах. Этиловый спирт метаболизируется до ацетальдегида, оказывающего общетоксическое действие, проявлением которого и является похмелье. Глутатион инактивирует свободные радикалы кислорода, образующиеся в митохондриях гепатоцитов в процессах их функционирования, образование которых зависит от интенсивности течения окислительно-восстановительных реакций. Поскольку метаболизм алкоголя протекает в несколько стадий (алкоголь – ацетальдегид – уксусная кислота) гепатоциты длительное время пребывают в условиях интенсификации метаболических процессов, когда в организм человека попадает большое его количество, что сопровождается образованием большого числа активных форм кислорода и реактивных метаболитов, инактивируемых глутатионом. В подобной ситуации не исключено замедление метаболизма ацетальдегида из-за возникшего истощения запасов восстановленного глутатиона, поэтому применение веществ, способных повышать содержание последнего, может способствовать активизации естественных детоксикационных систем, ускорить метаболизм ацетальдегида и облегчить похмельный синдром. Перспективным может стать применение с данной целью ацетилцистеина, который способен повышать содержание восстановленного глутатиона [14].

ЦЕЛЬЮ данного исследования стало экспериментальное обоснование применения ацетилцистеина в качестве предшественника глутатиона для снижения выраженности психоневрологических и когнитивных нарушений, возникающих на фоне острой алкогольной интоксикации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Все эксперименты были выполнены в соответствии с законодательством Российской Федерации и техническими стандартами Евразийского Экономического Союза по надлежащей лабораторной практике (ГОСТ Р 53434-2009, ГОСТ Р 51000.4-2011). Протокол исследования одобрен Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер: ИРБ 00005839 IORG 0004900 (ONRP), о чем свидетельствует выписка из протокола №132 от 20 мая 2019 г. Заседания Комиссии по экспертизе исследования Регионального этического комитета при ФГБОУ ВО ВолгГМУ.

Работу выполнили на самцах крыс линии *Wistar* (масса тела 300-350 г, питомник ФГУП «ПЛЖ «Рапполово»). После поступления из питомника животных помещали на карантин длительностью 14 дней в виварий ВолгГМУ, в помещении которого крысы содержались на протяжении эксперимента. Крыс содержали при $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в условиях 40–60% влажности в условиях сменяющегося цикла день/ночь (12/12 ч) с неограниченным доступом к корму и воде.

Дизайн исследования

До моделирования алкогольной интоксикации все крысы предварительно были обучены навыку поиска затопленной платформы в водном лабиринте Морриса, а также навыку пассивного избегания в тесте УРПИ (обучение в лабиринте Морриса заняло 4 предшествующих дня, а обучение и контрольное воспроизведение в УРПИ – 2 дня).

Животных распределили на 3 группы по 10 особей:

1. Интактная группа – физиологический раствор (15 мл/кг в/б и 5 мл/кг *per os*)
2. Контрольная группа – этанол (3 г/кг) + физиологический раствор (5 мл/кг);
3. Опытная группа – этанол (3 г/кг) + ацетилцистеин (1 г/кг);

Крысам из первой группы (интактная группа) вводили физиологический раствор (в/б и *per os*). Крысам контрольной и опытной группы однократно вводили 20% водный раствор этанола в дозе 3 г/кг (в/б), а затем (после пробуждения и фиксации исходных параметров) однократно вводили соответственно физиологический раствор (ООО «Гематек», РФ) или водный раствор ацетилцистеина (ЗАО «Сандоз», РФ) в дозе 1 г/кг (*per os*). Объем растворов при внутрибрюшном и внутрижелудочном введении составлял 15 и 5 мл/кг соответственно.

После введения этанола у животных регистрировали латентный период потери установочного рефлекса (способности вставать и опираться на конечности после переворота на спину) [15]. Продолжительность сна у животных составляла $8 \text{ ч} \pm 30 \text{ мин}$.

В течение 30 минут после пробуждения у животных оценивали исходный уровень психоневрологическо-

го и когнитивного дефицита с использованием шкалы «Combs and D'Alecy» и тестов: Адгезивный тест, Открытое поле, УРПИ и лабиринт Морриса. Затем крысам внутрижелудочно (в соответствии с группой) вводили ацетилцистеин или физиологический раствор. Животных, которые не просыпались спустя 8 часов 30 минут после введения этанола, исключали из эксперимента.

Спустя 3 часа тесты повторяли: неврологический дефицит оценивали по балльной шкале «Combs and D'Alecy» [16], в Адгезивном тесте у животных фиксировали скорость обнаружения и удаления инородного предмета незаметно закреплённого на волярной поверхности передних лап (длительность теста: 3 мин) [17], в Открытом поле оценивали двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность [18], а также оценивали когнитивную функцию: учитывали латентный период захода в тёмный отсек установки УРПИ [18] и скорость нахождения площадки в водном лабиринте Морриса [19].

После эвтаназии (декапитация под наркозом золетилом/ксилазином в дозе 20/8 мг/кг) у животных отбирали образцы тканей печени для последующего анализа. Концентрацию восстановленного глутатиона измеряли в реакции восстановления 5,5-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) [20]. Все реакции проводили в трипликатах.

Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами описательной и аналитической статистики. Распределение количественных показателей оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа с пост-тестом Ньюмена-Кейлса, а цифровые значения представляли в виде среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего арифметического (если не указано иное). Для оценки различий категориальных данных использовали критерий хи-квадрат.

РЕЗУЛЬТАТЫ

После внутрибрюшинного введения этанола подопытные крысы засыпали в течение нескольких минут и их сон длился в среднем 8 часов ± 30 минут. По времени наступления и продолжительности сна все отобранные в эксперимент животные были сопоставимы.

Постинтоксикационное состояние животных характеризовалось угнетённым поведением, они были вялые и медленно двигались, отмечалась выраженная сонливость (животные чаще пребывали в клетке с закрытыми глазами, прикосновение к ним вызывало определённую реакцию, сопровождающую непродолжительным движением). Всё это нашло отражение при проведении теста Открытое поле, в котором у животных отмечалась низкая ориентировочно-исследовательская и двигательная активность.

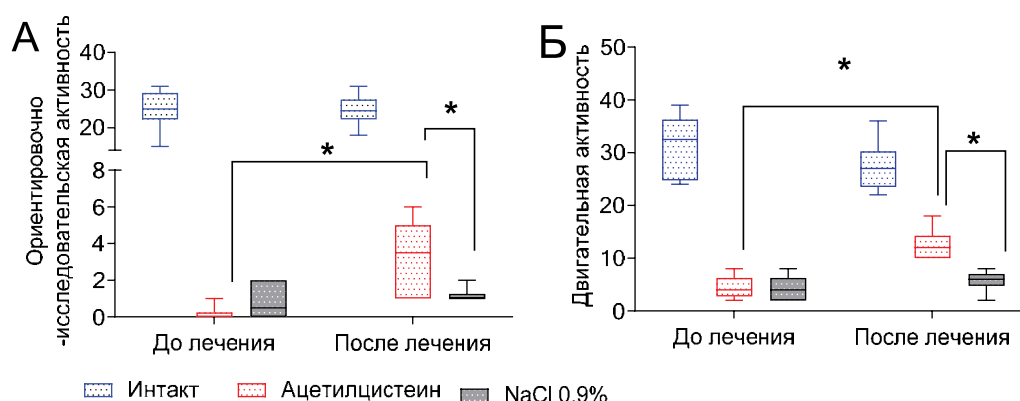


Рисунок 1 – Влияние ацетилцистеина на показатели ориентировочно-исследовательской (А) и двигательной (Б) активности в тесте открытое поле у крыс после острой алкогольной интоксикации

Примечание: * – $p < 0,05$ однофакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Ньюмена-Кеулса; сравниваемые выборки обозначены линиями; ориентировочно-исследовательская активность – сумма числа актов стоек и количества обследованных отверстий-норок; двигательная активность – количество пересеченных секторов установки.

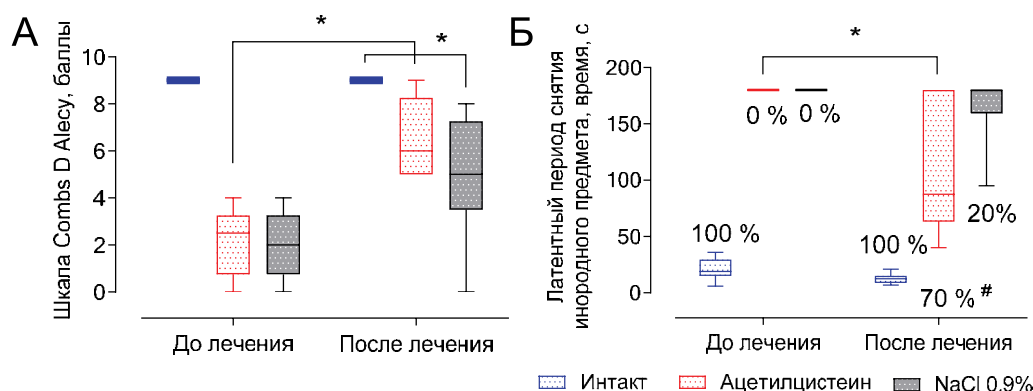


Рисунок 2 – Влияние ацетилцистеина на неврологический дефицит по шкале Combs and D' Alecy (А) и время снятия инородного предмета с волярной поверхности передних лап (Б) у крыс после острой алкогольной интоксикации

Примечание: * – $p < 0,05$ однофакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Ньюмена-Кеулса; # – $p < 0,05$ критерий хи-квадрат; % – количество животных в группе снявших инородный предмет с одной из лап; сравниваемые выборки обозначены линиями.

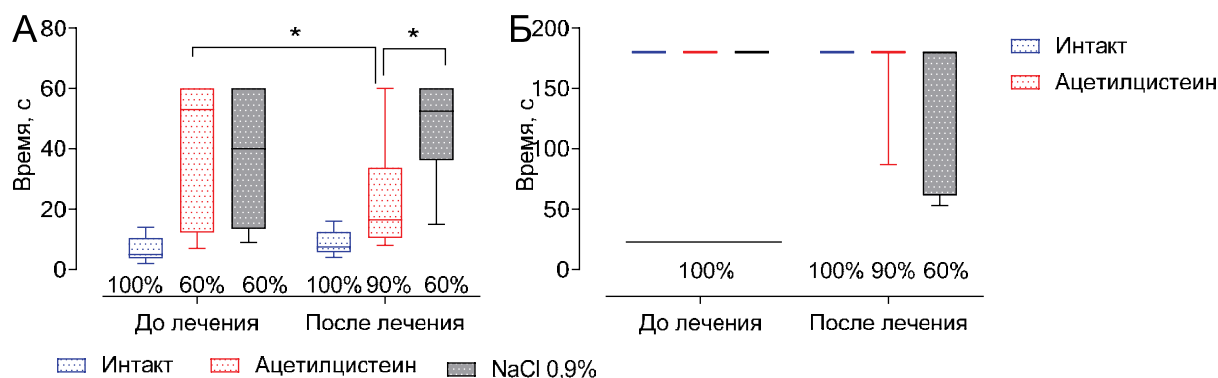


Рисунок 3 – Влияние ацетилцистеина на латентный период нахождения площадки в лабиринте Морриса, количество животных, нашедших площадку (А; в %); латентный период захода в темный отсек установки УРПИ и количество животных, не зашедших в него (Б) после острой алкогольной интоксикации

Примечание: * – $p < 0,05$ однофакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Ньюмена-Кеулса; % – количество животных нашедших площадку; сравниваемые выборки обозначены линиями.

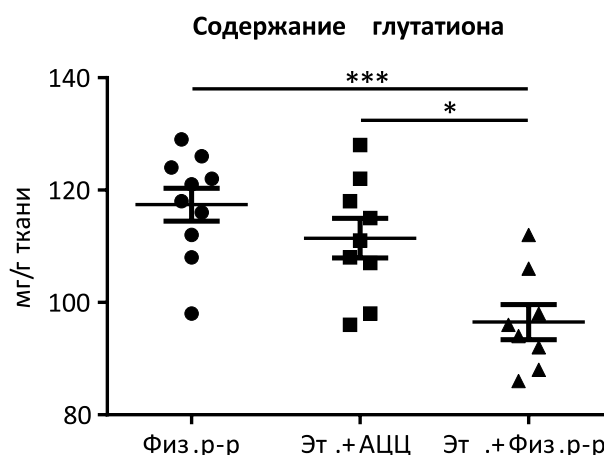


Рисунок 4 – Влияние однократного перорального введения ацетилцистеина на содержание глутатиона в гомогенатах печени крыс, после острой алкогольной интоксикации

Примечание: Физ. р-р – физиологический раствор; Эт.+АЦЦ – этанол и ацетилцистеин; Эт.+Физ. р-р – этанол и физиологический раствор; данные представлены в виде усредненных индивидуальных значений ($n = 3$ в каждой из точек), среднего арифметического значения и стандартной ошибки среднего арифметического; *, *** – $p < 0,05$ и $p < 0,0001$ соответственно (однофакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Ньюмена-Кеулса); сравниваемые выборки обозначены горизонтальными линиями.

Через 3 часа после проведения терапии в контрольной группе сохранились низкие показатели в тесте Открытое поле в то время, как у животных, которым перорально ввели водный раствор ацетилцистеина двигательная и ориентировочно-исследовательская активности оказались значительно выше (Рисунок 1). Таким образом, у животных, которым вводили ацетилцистеин, наблюдалось быстрое восстановление локомоторной и исследовательской активности после алкогольной интоксикации.

При оценке неврологического дефицита по шкале «Combs and D' Alecy» после пробуждения у животных отмечали симптомы тяжелого психоневрологического дефицита, выраженность которых снизилась через 3 часа после перорального введения физиологического раствора и значительно уменьшились после введения ацетилцистеина (Рисунок 2, А).

При оценке сенсорно-моторной функции в адгезивном тесте, после пробуждения животные не реагировали на инородный предмет, закрепленный на волярной поверхности их лап. Через 3 часа после первого тестирования и проведения лечения у животных, перенесших острое алкогольное отравление пероральное введение физиологического раствора не улучшало их сенсорно-моторную функцию поскольку только 2 из 10 животных были способны удалить стикер (как минимум с одной лапы), в то время как в группе, получавшей ацетилцистеин 7 из 10 животных обнаружили и удалили инородный предмет минимум с одной лапы ($p < 0,05$) и сделали это значительно ($p < 0,05$) быстрее, чем в предыдущий раз (Рисунок 2, Б).

Все животные в течение 4 дней перед внутрибрюшинным введением алкоголя обучались навыку поиска затопленной площадки в водном лабиринте

Морриса, а за 2 дня до алкоголизации у них формировался условный рефлекс пассивного избегания темного отсека установки УРПИ. Все крысы после пробуждения, находящиеся в состоянии, которое возможно трактовать как похмелье, в одинаковой степени плохо помнили место расположения площадки в водном лабиринте Морриса (Рисунок 3, А). В установке УРПИ эти животные демонстрировали крайне низкую двигательную активность, пребывая в одном из углов, практически не исследуя её внутреннее пространство, поэтому объективно оценить сохранность их мнестической функции в тесте УРПИ после пробуждения довольно трудно.

При тестировании спустя 3 часа после проведения лечения было отмечено, что пероральное введение физиологического раствора практически не влияло на результаты поведения животных в водном лабиринте Морриса и на сохранность условного рефлекса в УРПИ, в то время как крысы, которым ввели ацетилцистеин значительно быстрее и в большем количестве находили площадку в водном лабиринте Морриса и избегали посещения темного отсека в тесте УРПИ (Рисунок 3А, Б). По результатам тестирования крыс в водном лабиринте Морриса и тесте УРПИ можно сделать вывод о том, что острое введение больших доз алкоголя животным вызывает у них выраженное нарушение памяти, что в значительной степени нивелируется введением ацетилцистеина.

На завершающем этапе исследования после эвтаназии производили забор образцов тканей печени для определения содержания глутатиона. У крыс из контрольной группы, которым вводили этанол и физиологический раствор, содержание глутатиона в гомогенатах печени достигли $96,5 \pm 3,11$ мг/г ткани (против $117,4 \pm 2,95$ мг/г ткани у интактных живот-

ных; $p < 0,0001$). У крыс, которым вводили ацетилцистеин, содержание глутатиона ($111,4 \pm 3,52$ мг/г ткани) было лишь незначительно ниже, чем у животных интактной группы и значительно выше, чем у животных контрольной группы ($p < 0,05$; Рисунок 4). Таким образом, однократное введение ацетилцистеина повышало содержание восстановленного глутатиона в печени и, вероятно, способствовало снижению выраженности алкогольной интоксикации.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Употребление алкоголя в современном обществе очень распространено ввиду увеличения стрессогенной нагрузки и доступности алкоголя. Похмелье – частое нежелательное явление, сопровождающее прием алкогольных напитков, который, несмотря на распространённость, редко входит в круг интересов медицинской науки. Есть несколько социальных и клинических негативных последствий, связанных с появлением похмелья, таких как экономические затраты, связанные с неэффективной работой или учёбой [1, 2].

Окисление этанола под действием алкогольдегидрогеназы приводит к образованию ацетальдегида, который превращается в ацетат; обе эти последовательные и потом параллельные реакции уменьшают никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и увеличивают концентрацию НАДН, снижая количество восстановленного глутатиона [21]. Повышение НАДН вызывает ряд метаболических нарушений, включая гиперлактацедемию, которая способствует ацидозу и снижает экскрецию мочевой кислоты с мочой. Это приводит к вторичной гиперурикемии, которая усугубляется вызванным алкоголем кетозом и усиливает ацетат-опосредованный распад АТФ. НАДН также препятствует глюконеогенезу, тем самым способствуя гипогликемии, повышает уровень α -глицерофосфата, ингибирует цикл Кребса и окисление жирных кислот. Ингибирование окисления жирных кислот способствует стеатозу и гиперлипидемии с участием всех классов липидов. Ацетальдегид оказывает прямое токсическое действие на клетку и её органеллы, препятствует восстановлению алкилированных нуклеопротеинов, снижает активность ключевых ферментов и заметно снижает эффективность метаболизма кислорода в митохондриях. Кроме того, ацетальдегид способствует гибели клеток, истощая уровень восстановленного глутатиона, вызывая перекисное окисление липидов и увеличение токсического эффекта свободных радикалов кислорода. Связываясь с тубулином микротрубочек, ацетальдегид блокирует секрецию белков. Увеличение количества белка, липидов, воды и электролитов вызывает увеличение размеров гепатоцитов. Ацетальдегид-белковые аддукты способствуют производству коллагена и могут действовать как неоантигены, которые стимулируют иммунный ответ. Этанол подавляет синтез восста-

новленного глутатиона, потеря этого соединения в митохондриях печени способствует повреждению органелл гепатоцитов и снижению их эффективности в отношении утилизации ксенобиотиков [21, 22].

Ацетилцистеин был первоначально запатентован в 1960 году и лицензирован для использования в 1968 году. Он включен в Список основных лекарственных средств ВОЗ, наиболее эффективных и безопасных лекарств, необходимых в системе здравоохранения в качестве препарата применяемого при передозировке парацетамола и для проведения муколитической терапии [23]. Это соединение выступает в роли предшественника L-цистеина, из которого образуется антиоксидант глутатион. Глутатион содержит пептидную связь между аминокислотой цистеина и карбоксильной группой боковой цепи глутамата. Значение глутатиона в клетке определяется его антиоксидантными свойствами. Фактически глутатион не только защищает клетку от токсичных свободных радикалов, но и в целом определяет окислительно-восстановительные характеристики внутриклеточной среды. В клетке тиоловые группы находятся в восстановленном состоянии в концентрации около 5 ммоль/л. Фактически такая высокая концентрация глутатиона в клетке приводит к тому, что он восстанавливает любую дисульфидную связь, образующуюся между остатками цистеина внутриклеточных белков. Это сопровождается окислением восстановленной формы глутатиона. Восстанавливается окисленный глутатион под действием фермента глутатионредуктазы, который постоянно находится в клетке в активном состоянии и индуцируется при окислительном стрессе. Соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона в клетке является одним из важнейших параметров, который определяет уровень окислительного стресса, который нарастает в период употребления алкоголя и развития похмелья [22, 24].

Введение ацетилцистеина способствует пополнению запасов глутатиона, который не только выполняет важнейшую функцию по обезвреживанию активных форм кислорода, но и вместе с окисленным глутатионом и S-нитрозоглутатионом связывается с сайтом распознавания глутамата рецепторов NMDA и AMPA (через их γ -глутамильные фрагменты) и может являться эндогенным нейромодулятором. При миллимолярных концентрациях они также могут модулировать окислительно-восстановительное состояние рецепторного комплекса NMDA [25].

Глутатион модулирует рецептор NMDA, воздействуя на окислительно-восстановительный сайт. L-цистеин также служит предшественником цистина, который, в свою очередь, служит субстратом для антипортера цистин-глутамата на астроцитах, следовательно, увеличивает выброс глутамата во внеклеточное пространство, где он действует на рецепторы mGluR 2/3, а при более высоких дозах ацетилцисте-

ина – mGluR 5 [26], что важно, поскольку похмельный синдром сопровождается депрессией нейромедиаторов, восстановление баланса которых может способствовать скорейшему восстановлению нейрокognитивных функций. Ацетилцистеин оказывает некоторые противовоспалительные эффекты, возможно, посредством ингибирования транскрипционного фактора NF-κB и модуляции синтеза цитокинов [27].

Основываясь на данных, полученных в доклинических и ограниченных клинических исследованиях, ацетилцистеин, по-видимому, нормализует нейротрансмиссию глутамата в прилежащее ядро и другие структуры мозга, частично за счет усиления экспрессии возбуждающего переносчика аминокислот 2, известного как переносчик глутамата 1 у лиц с зависимостью. У взрослых людей с кокаиновой зависимостью ацетилцистеин модулирует нейротрансмиссию глутамата, чего не наблюдается у людей без зависимости [28]. Это исследование, в совокупности с представленными данными, позволяет предположить, что применение ацетилцистеина с целью улучшения самочувствия при похмелье может оказывать

двойное действие, с одной стороны облегчая метаболизм ксенобиотиков в печени, а с другой оказывая нейропротекторное и активирующее действие, способствуя снижению тяги к алкоголю. Ацетилцистеин, действующий как модулятор нейротрансмиссии глутамата и дофамина, обладающий выраженным антиоксидантным эффектом, представляет собой перспективное соединение для дальнейшей разработки лекарственных средств, предназначенных для коррекции постинтоксикационного состояния, вызванного употреблением высоких доз этанола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На фоне острой алкогольной интоксикации введение ацетилцистеина, способствует восстановлению содержания глутатиона в печени и приводит к снижению выраженности нарушений психоневрологических и когнитивной функций у экспериментальных животных. Результаты исследования указывают на перспективность применения ацетилцистеина с целью устранения выраженности похмельного синдрома.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данная работа была выполнена при грантовой поддержке Президента Российской Федерации по Соглашению о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий в соответствии с п. 4 ст. 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации (внутренний номер МК-3454.2019.7) № 075-15-2019-176 от 23.05.2019 г.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Mackus M., Adams S., Barzilay A., Benson S., Blau L., Iversen J., Johnson S.J., Keshavarzian A., Scholey A., Smith G.S., Trela C., Vatsalya V., Verster J.C. Proceeding of the 8th Alcohol Hangover Research Group Meeting. *Curr Drug Abuse Rev.* 2016. V. 9, N 2. P. 106–112. doi: 10.2174/1874473709666161229121527.
2. Penning R., McKinney A., Verster J.C. Alcohol hangover symptoms and their contribution to the overall hangover severity. *Alcohol Alcohol.* 2012. V. 47, N 3. P. 248–252. doi: 10.1093/alcalc/ags029.
3. Devenney L.E., Coyle K.B., Verster J.C. Memory and attention during an alcohol hangover. *Hum Psychopharmacol.* 2019. V. 34, N 4. P. e2701. doi: 10.1002/hup.2701.
4. Grange J.A., Stephens R., Jones K., Owen L. The effect of alcohol hangover on choice response time. *J Psychopharmacol.* 2016 V. 30, N 7. P. 654–661. doi: 10.1177/0269881116645299.
5. Verster J.C., Bervoets A.C., de Klerk S., Vreman R.A., Olivier B., Roth T., Brookhuis K.A. Effects of alcohol hangover on simulated highway driving performance. *Psychopharmacology (Berl).* 2014 V. 231, N 15. P. 2999–3008. doi: 10.1007/s00213-014-3474-3479.
6. Sarkola T., Eriksson C.J. Testosterone increases in men after a low dose of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003. V. 27, N 4. P. 682–685. doi: 10.1097/01.alc.0000060526.43976.68
7. Alomary A.A., Vallée M., O'Dell L.E., Koob G.F., Purdy R.H., Fitzgerald R.L. Acutely administered ethanol participates in testosterone synthesis and increases testosterone in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003. V. 27, N 1. P. 38–43. doi: 10.1097/01.alc.0000047304.28550.4f
8. Penning R., McKinney A., Bus L.D., Olivier B., Slot K., Verster J.C. Measurement of alcohol hangover severity: development of the Alcohol Hangover Severity Scale (AHSS). *Psychopharmacology (Berl).* 2013. V. 225, N 4. P. 803–810. doi: 10.1007/s00213-012-2866-y.
9. Thørrisen M.M., Bonsaksen T., Hashemi N., Kjekshus I., van Mechelen W., Aas R.W. Association between alcohol consumption and impaired work performance (presenteeism): a systematic review. *BMJ Open.* 2019. V. 9, N 7. P. e029184. doi: 10.1136/bmjopen-2019-029184.
10. Swift R., Davidson D. Alcohol hangover: mechanisms and mediators. *Alcohol Health Res World.* 1998. V. 22, N 1. P. 54–60.
11. Labhart F., Livingston M., Engels R., Kuntsche E. After how many drinks does someone experience acute consequences-determining thresholds for binge drinking based on two event-level studies. *Addiction.* 2018. V. 113, N 12. P. 2235–2244. doi: 10.1111/add.14370.
12. Lam T., Liang W., Chikritzhs T., Allsop S. Alcohol and other drug use at school leavers' celebrations. *J Public Health*

- (Oxf). 2014. V. 36, N 3. P. 408-416. doi: 10.1093/pubmed/fdt087.
13. Verster J.C., Penning R. Treatment and prevention of alcohol hangover. *Curr Drug Abuse Rev.* 2010. V. 3, N 2. P. 103–109. doi: 10.2174/1874473711003020103
 14. Green J.L., Heard K.J., Reynolds K.M., Albert D. Oral and intravenous acetylcysteine for treatment of acetaminophen toxicity: a systematic review and meta-analysis. *West J Emerg Med.* 2013. V. 14, N 3. P. 218–226. doi: 10.5811/westjem.2012.4.6885.
 15. Морковин Е.И., Куркин Д.В., Тюренков И.Н. Оценка психоневрологического дефицита у грызунов: основные методы. *Журнал высшей нервной деятельности им. И. П. Павлова.* 2018. V. 68, N 1. P. 3–15. doi: 10.7868/s004446771801001x
 16. Combs D.J., D'Alecy L.G. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol. *Stroke.* 1987. V. 18, N 2. P. 503–511.
 17. Bouet V., Boulouard M., Toutain J., Divoux D., Bernaudin M., Schumann-Bard P., Freret T. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. *Nat Protoc.* 2009. V. 4, N 10. P. 1560–1564. doi: 10.1038/nprot.2009.125
 18. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под ред. А.Н. Миронова. Ч. 1. М.: ГрифиК, 2012. 944 с.
 19. Vorhees C.V., Williams M.T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 2006. V. 1, N 2. P. 848–858. doi: 10.1038/nprot.2006.116.
 20. Shaik I.H., Mehvar R. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: Application to the rat liver and bile samples. *Anal Bioanal Chem.* 2006. V. 385, N 1. P. 105–113. doi: 10.1007/s00216-006-0375-8.
 21. Cederbaum A.I. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis.* 2012. V. 16, N 4. P. 667–685. doi: 10.1016/j.cld.2012.08.002.
 22. Rushworth G.F., Megson I.L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther.* 2014. V. 141, N 2. P. 150–159. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.09.006.
 23. Green J.L., Heard K.J., Reynolds K.M., Albert D. Oral and intravenous acetylcysteine for treatment of acetaminophen toxicity: a systematic review and meta-analysis. *West J Emerg Med.* 2013. V. 14, N 3. P. 218–226. doi: 10.5811/westjem.2012.4.6885.
 24. Aldini G., Altomare A., Baron G., Vistoli G., Carini M., Borsani L., Sergio F. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic Res.* 2018. V. 52, N 7. P. 751–762. doi: 10.1080/10715762.2018.1468564.
 25. Oja S.S., Janáky R., Varga V., Saransaari P. Modulation of glutamate receptor functions by glutathione. *Neurochem Int.* 2000. V. 37, N 2–3. P. 299–306. doi: 10.1016/s0197-0186(00)00031-0
 26. Chen H.H., Stoker A., Markou A. The glutamatergic compounds sarcosine and N-acetylcysteine ameliorate prepulse inhibition deficits in metabotropic glutamate 5 receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2010. V. 209, N 4. P. 343–350. doi: 10.1007/s00213-010-1802-2.
 27. Paterson R.L., Galley H.F., Webster N.R. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit Care Med.* 2003. V. 31, N 11. P. 2574–2578. doi: 10.1097/01.ccm.0000089945.69588.18
 28. Kupchik Y.M., Moussawi K., Tang X.C., Wang X., Kalivas B.C., Kolokithas R., Ogburn K.B., Kalivas P.W. The effect of N-acetylcysteine in the nucleus accumbens on neurotransmission and relapse to cocaine. *Biol Psychiatry.* 2012. V. 71, N 11. P. 978–986. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.10.024.

АВТОРЫ

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НЦИЛС ВолгГМУ, заведующий Межкафедральным центром отработки практических навыков и НИР фармацевтического факультета ВолгГМУ. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1116-3425>. E-mail: stran-nik986@mail.ru

Морковин Евгений Игоревич – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией нейропсихофармакологии НЦИЛС ВолгГМУ, старший научный сотрудник лаборатории геномных и протеомных исследований ВМНЦ. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-7119-3546>. E-mail: e.i.morkovin@gmail.com

Осадченко Назар Андреевич – студент-исследователь, 6 курс медико-биологического факультета ВолгГМУ. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7398-2186>. E-mail: n.a.osadchenko@gmail.com

Кнышова Лилия Петровна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории нейропсихофармакологии НЦИЛС ВолгГМУ, младший научный сотрудник лаборатории геномных и

протеомных исследований ВМНЦ. E-mail: knyshova-liliya@inbox.ru.

Бакулин Дмитрий Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НЦИЛС ВолгГМУ. ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4694-3066>. E-mail: mbfdoc@gmail.com

Абросимова Елизавета Евгеньевна – студент-исследователь, 6 курс медико-биологического факультета ВолгГМУ. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6472-6906>. E-mail: abrosimiva.volgmed@gmail.com

Горбунова Юлия Васильевна – делопроизводитель кафедры фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1116-3425>. E-mail: yvgorbunova@yandex.ru

Тюренков Иван Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий лабораторией фармакологии сердечно-сосудистых средств НЦИЛС ВолгГМУ, заведующий кафедрой фармакологии и биофармации ФУВ ВолгГМУ. ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7574-3923>. E-mail: fibfuv@mail.ru

УДК: 612.115.3



КОМПЛЕКСНОЕ СОЕДИНЕНИЕ PRO-GLY-PRO-LEU С ГЕПАРИНОМ: ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКИЙ, ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИЙ И АНТИКОАГУЛЯНТНЫЙ ЭФФЕКТЫ У КРЫС С ГИПЕРГЛИКЕМИЕЙ

Т.Ю. Оберган¹, Н.Ф. Мясоедов², М.Е. Григорьева¹, Л.А. Ляпина¹, Т.А. Шубина¹, Л.А. Андреева²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Лаборатория защитных систем крови имени проф. Б. А. Кудряшова
119234, Россия, Москва, Ленинские горы, 1/12

² Институт молекулярной генетики РАН
123182, Россия, Москва, ул. Курчатова, 2

E-mail: tobergan@mail.ru

Получено 20.09.2019

Рецензия (1) 09.10.2019

Рецензия (2) 15.10.2019

Принята к печати 21.10.2019

Ранее показано, что применение регуляторных пептидов семейства глипролинов способствует нормализации системы гемостаза и уровня глюкозы крови при экспериментальной стойкой гипергликемии у крыс, подобной сахарному диабету 2 типа у человека. Также известно, что антикоагулянт гепарин подавляет свертывание крови и проявляет гипогликемическое действие в организме.

Цель исследования. Получить комплекс пептида Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL) и нефракционированного гепарина, изучить его влияние на уровень глюкозы и антикоагулянтно-фибринолитические свойства и показать его способность восстанавливать нарушенные функции инсулярной и свертывающей систем крови при экспериментальной гипергликемии у крыс.

Материалы и методы. Использовались лабораторные крысы-самцы линии Wistar, интактные и с экспериментально вызванной гипергликемией. Было создано комплексное соединение PGPL и гепарина при соотношении компонентов 1: 1 (моль/моль), которое вводили один раз в сутки в течение 5 дней интраназально в дозе 1 мг/кг гипергликемическим крысам. Подобным образом вводили составные части комплекса в эквивалентных количествах. Определяли антикоагулянтную активность по тесту активированного частичного тромбопластинового времени, параметры фибринолиза по тестам суммарной, ферментативной и неферментативной фибринолитической активности, а также активности тканевого активатора плазминогена. Кроме того, проводилось измерение уровня глюкозы крови с использованием специальных тест-полосок.

Результаты. Применение комплекса PGPL-гепарин у животных с гипергликемией приводило к нормализации уровня глюкозы крови, повышению антикоагулянтного и фибринолитического фона плазмы крови. Эти эффекты сохранялись в течение 6 дней после прекращения введения крысам пептидно-гепаринового комплекса.

Выводы. Комплекс PGPL с гепарином проявляет комбинированное гипогликемическое, антикоагулянтное и фибринолитическое ферментативной и неферментативной природы действие при развитии экспериментальной гипергликемии. Исследуемый пептидно-гепариновый комплекс в перспективе может применяться для профилактики и лечения сахарного диабета 2 типа, осложняющегося повышенной свертываемостью крови.

Ключевые слова: антикоагулянтная активность; уровень глюкозы крови; комплексное соединение; фибринолиз; глипролиновые пептиды; гипергликемия; сахарный диабет 2 типа

Для цитирования: Т.Ю. Оберган, Н.Ф. Мясоедов, М.Е. Григорьева, Л.А. Ляпина, Т.А. Шубина, Л.А. Андреева. Комплексное соединение pro-gly-pro-leu с гепарином: гипогликемический, фибринолитический и антикоагулянтный эффекты у крыс с гипергликемией. *Фармация и фармакология*. 2019;7(5):300-307. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-300-307

© Т.Ю. Оберган, Н.Ф. Мясоедов, М.Е. Григорьева, Л.А. Ляпина, Т.А. Шубина, Л.А. Андреева, 2019

For citation: T.Yu. Obergan, N.F. Myasoedov, M.E. Grigorjeva, L.A. Lyapina, T.A. Shubina, L.A. Andreeva. Complex compound of pro-gly-pro-leu with heparin: hypoglycemic, fibrinolytic and anticoagulant effects in rats with hyperglycemia. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(5):300-307. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-5-300-307

COMPLEX COMPOUND OF PRO-GLY-PRO-LEU WITH HEPARIN: HYPOGLYCEMIC, FIBRINOLITIC AND ANTICOAGULANT EFFECTS IN RATS WITH HYPERGLYCEMIA

T.Yu. Obergan¹, N.F. Myasoedov², M.E. Grigorjeva¹, L.A. Lyapina¹, T.A. Shubina¹, L.A. Andreeva²

¹ Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Laboratory of protective blood systems
n. a. prof. B. A. Kudryashov, 1/12, Leninskiye gory, Moscow, Russia 119234

² Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, 2, Kurchatov St., Moscow, Russia 123182

E-mail: tobergan@mail.ru

Received 20 September 2019

Review (1) 09 October 2019

Review (2) 15 October 2019

Accepted: 21 October 2019

Previously it was shown that the use of regulatory peptides of the glyprolin family helps to normalize the hemostasis system and blood glucose levels in experimental resistant hyperglycemia in rats, similar to type 2 diabetes mellitus in humans. It is also known that the anticoagulant heparin inhibits blood coagulation and exhibits a hypoglycemic effect in the body.

The aim of the study is to obtain a complex of the Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL) peptide and the unfractionated heparin, to study its effect on glucose and anticoagulant fibrinolytic properties and show its ability to restore the impaired functions of the insular and coagulating blood systems in experimental hyperglycemia in rats.

Materials and Methods. Laboratory Wistar male rats, intact and with experimentally induced hyperglycemia, were used in the experiment. A complex compound of PGPL and heparin was created with a component ratio of 1:1 (mol/mol), which was administered intranasally to hyperglycemic rats once a day for 5 days at the dose of 1 mg/kg. Similarly, the constituent parts of the complex were administered in equivalent amounts. The anticoagulant activity was determined by the test of activated partial thromboplastin time, fibrinolysis parameters – by tests of total, enzymatic and non-enzymatic fibrinolytic activities, as well as the activity of a tissue plasminogen activator. In addition, blood glucose was measured using special test strips.

Results. The use of the PGPL-heparin complex in the animals with hyperglycemia led to normalization of blood glucose levels, an increase in the anticoagulant and fibrinolytic background of blood plasma. These effects persisted for 6 days after the cancellation of the peptide-heparin complex administration to rat.

Conclusion. In the development of experimental hyperglycemia, the PGPL complex with heparin exhibits a combined hypoglycemic, anticoagulant and fibrinolytic enzymatic and non-enzymatic nature of the effect. In the future, the studied peptide-heparin complex can be used for the prevention and treatment of type 2 diabetes mellitus, complicated by increased blood coagulation.

Key words: anticoagulant activity; blood glucose level; complex compound; fibrinolysis; glyprolin peptides; hyperglycemia; type 2 diabetes mellitus (T2DM)

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что заболеваемость сахарным диабетом 2 типа (инсулиннезависимым, СД2) постоянно растет. Сахарный диабет – это комплекс физиологических дисфункций, характеризующихся стойким повышением глюкозы крови (гипергликемия), обусловленное инсулинорезистентностью, недостаточной секрецией инсулина и избыточным выделением глюкогона в кровь [1, 2]. Гипергликемия и развитие сахарного диабета обычно сопровождаются дисфункцией противосвертывающей системы (ПСС) и гиперкоагуляцией, проявляющейся повышением агрегации тромбоцитов, снижением антикоагулянтной и фибринолитической активности крови [3, 4].

Имеются данные о том, что такие аминокислоты как аргинин, лейцин играют важную роль в профилактике сахарного диабета. Лейцин стимулирует выработку инсулина поджелудочной железой, что приводит к нормальному уровню глюкозы в крови больных сахарным диабетом [5, 6].

Короткие регуляторные пролин- и глицинсодер-

жащие пептиды (глипролины) постоянно вырабатываются в организме в процессе синтеза и деградации коллагена [7]. Некоторые глипролины (Arg-Pro-Gly-Pro, Gly-Pro-Arg, Leu-Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu) проявляют защитный антидиабетогенный эффект, одновременно стабилизируя показатели гемостаза при метаболических нарушениях. Показано, что многократное интраназальное введение этих пептидов крысам со стойкой гипергликемией (подобной начальной стадии СД2 человека) приводило к положительным изменениям в инсулярной и свертывающей системах организма. При этом отмечено снижение уровня глюкозы, повышение антикоагулянтной и фибринолитического потенциала плазмы, а также угнетение агрегации тромбоцитов в плазме крови животных [3, 4, 8, 9].

Один из природных антикоагулянтов системы гемостаза – гепарин является компонентом внутренней среды организма, который синтезируется тучными клетками печени, базофильными лейкоцитами и другими клетками. Он относится к антикоагулянтам быстрого действия, ингибирует тромбин-свертываю-

шую активность, а также проявляет гипогликемическое действие в организме. Гепарин способен образовывать комплексы с аминокислотами и пептидами за счет наличия в его молекуле структурных областей связывания с этими лигандами [10, 11]. Экспериментально показано, что введение животным гепариновых комплексов с глипролинами приводило к повышению антикоагулянтной, фибринолитической и антитромботической активности крови [12, 13].

Было установлено, что интраназальное введение комплекса гепарина с пептидом Arg-Pro-Gly-Pro животным с гипергликемией повышает антикоагулянтные свойства плазмы крови, фибринолитическую активность ферментативной и неферментативной природы, снижает агрегацию тромбоцитов и защищает крыс от развития сахарного диабета [13].

В настоящем исследовании изучались гипогликемические, антикоагулянтные и фибринолитические эффекты созданного нами комплекса пептида Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL) с нефракционированным гепарином при его многократном интраназальном введении животным со стойкой гипергликемией, подобной СД2 у человека.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Получить комплекс пептида Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL) и нефракционированного гепарина, изучить его влияние на уровень глюкозы и антикоагулянтно-фибринолитические свойства и показать его способность восстанавливать нарушенные функции инсулярной и свертывающей систем крови при экспериментальной гипергликемии у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение комплекса PGPL-гепарин

В данном исследовании мы использовали нефракционированный гепарин фирмы Serva (Германия). Пептид PGPL был синтезирован в Институте молекулярной генетики РАН (Москва, Россия). Комплексное соединение этого пептида с гепарином при соотношении компонентов 1:1 (моль/моль) было создано по ранее описанному протоколу с некоторой нашей модификацией [12].

Гепарин и пептид PGPL растворяли в дистиллированной воде, перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, pH 7.2. Продукт реакции осаждали 1%-ой уксусной кислотой, pH 5.0–5.2 и центрифугировали в течение 30 мин при 3000xg, осадок растворяли в 0.85%-м NaCl (физиологическом растворе), pH 7.2–7.4.

Образование связи между гепарином и пептидом оценивали с помощью перекрестного электрофореза при 20°C в 0,053 М фосфатном буфере, pH 7.0 при градиенте потенциала 7.3 в/см в течение 2 ч. Далее электрофореграммы окрашивали 0,033%-ым раствором Азура II, который выявляет кислые группы гепарина [12].

Животные, дизайн исследования и введение препаратов

50 крыс-самцов линии Wistar (возраст 10 мес., масса

тела 320–350 г) были получены из Научного центра биомедицинских технологий, филиал «Столбовая» (Москва, Россия). Животные содержались в пластиковых клетках в стандартных условиях вивария при температуре окружающей среды (21–24°C), 12-часовом цикле день/ночь и относительной влажности воздуха 60±10% при свободном доступе к пище и воде в период эксперимента. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с соблюдением этических принципов по использованию лабораторных животных и были одобрены локальным этическим комитетом (Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия).

После адаптации в течение 10 дней все животные были разделены на 5 групп по 10 крыс в каждой (рис. 1).

Группа 1 – крысы с гипергликемией, получавшие 0,85%-й физиологический раствор.

Группа 2 – крысы с гипергликемией, получавшие комплекс PGPL-гепарин (1 мг/кг массы тела).

Группа 3 – крысы с гипергликемией, получавшие PGPL (20 мкг/кг массы тела).

Группа 4 – крысы с гипергликемией, получавшие гепарин (0,98 мг/кг массы тела).

Группа 5 состояла из здоровых животных.

Растворенные в 0,85%-м растворе натрия хлорида препараты (комплексное соединение PGPL-гепарин, пептид PGPL и гепарин) готовили ежедневно перед введением животным. Доза комплекса PGPL-гепарин была выбрана на основании предыдущих исследований [13]. Дозы компонентов комплекса, т. е. пептида PGPL и гепарина, были эквивалентны их содержанию в комплексном соединении.

Экспериментальную стойкую гипергликемию (ГГ) у крыс групп 1–4 индуцировали ежедневным однократным внутрижелудочным введением 40%-го раствора глюкозы в дозе 2,5 мл/кг массы тела в течение 7 дней, после чего крысы этих групп продолжали получать раствор глюкозы в течение всего эксперимента. После развития ГГ крысам 2–4 групп интраназально вводили исследуемые препараты в объеме 25 мкл один раз в сутки в течение 5 дней. Крысы 1-й и 5-й групп в те же сроки получали интраназально 0.85%-й NaCl в качестве плацебо.

На 22-й день эксперимента, через 1 ч после последнего введения препаратов, у каждого животного отбирали кровь для биохимических анализов. В конце эксперимента (28-е сутки) повторный забор крови проводили через 1 ч после последнего введения глюкозы на фоне отмены приема препаратов.

Проведение биохимических анализов

Кровь для анализа брали из яремной вены (*vena jugularis*), используя в качестве консерванта 3.8%-й цитрат натрия в соотношении кровь:консервант как 9:1. В цельной крови определяли концентрацию глюкозы с помощью анализатора Accutrend GC (Roche, Германия) с использованием специальных тест-полосок.

Ежедневное пероральное введение 40% раствора глюкозы (группы 1–4)									
1 день									
Адаптация к условиям вивария					11 день				
						18 день			
					Интраназальное введение: Группа 1 – 0,85% физ.р-р Группа 2 – Комплекс Группа 3 – PGPL Группа 4 – Гепарин Группа 5 – 0,85% физ. р-р				
							22 день		
								1-е взятие крови	
									28 день
									2-е взятие крови

Рисунок 1 – Схема проведения эксперимента



Рисунок 2 – Электрофореграммы передвижения в электрическом поле отдельно гепарина и гепарина, взаимодействующего с пептидом.

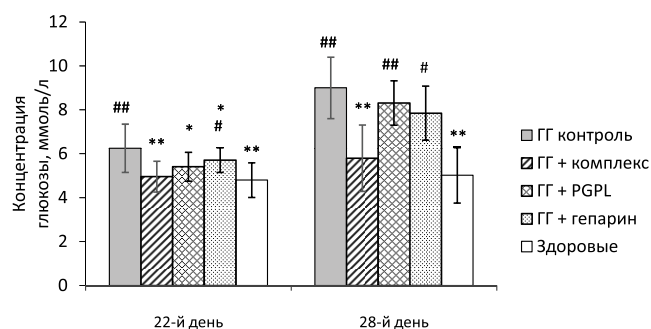


Рисунок 3 – Уровень глюкозы крови (ммоль/л) на 22-й день (через 1 ч после 5-го введения препаратов) и на 28-й день эксперимента (через 6 дней после отмены введения препаратов).

Примечание: * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ – по сравнению с ГГ контролем (группа 1), # $P < 0.05$ и ## $P < 0.01$ – по сравнению со здоровыми животными (группа 5).

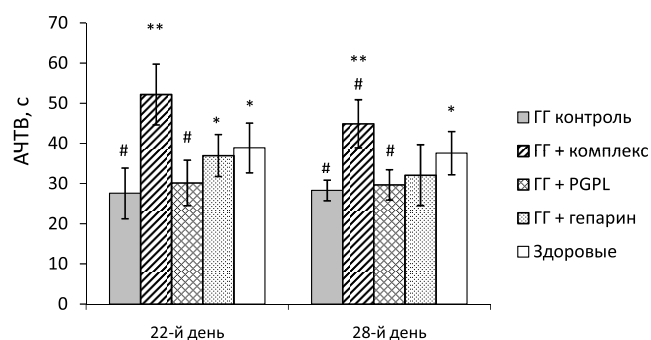


Рисунок 4 – Антикоагулянтная активность плазмы крови (по тесту АЧТВ) на 22-й день (через 1 ч после 5-го введения препаратов) и на 28-й день эксперимента (через 6 дней после отмены введения препаратов).

Примечание: * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ – по сравнению с ГГ контролем (группа 1), # $P < 0.05$ и ## $P < 0.01$ – по сравнению со здоровыми животными (группа 5).

Далее кровь центрифугировали при 2000×g в течение 15 мин при комнатной температуре для получения бедной тромбоцитами плазмы, в которой оценивали антикоагулянтную активность по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) на анализаторе свертывания крови «АСК 2-01» (Россия); показатели фибринолиза по тестам суммарной (СФА), неферментативной (НФ) фибринолитической активности на нестабилизированном фибрине, ферментативной фибринолитической активности (ФФ) и активности тканевого активатора пламиногена (ААП) в эуглобулиновой фракции плазмы на стабилизированном фибрине [14].

Все данные обработаны статистически и выражены в виде среднего $\pm$ SD (стандартное отклонение). Нормальность распределения выявляли по критерию Шапиро-Уилка, групповые различия анализировали методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с применением критерия Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений. Статистически значимыми считались значения $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение комплексного соединения

PGPL-гепарин

Установлено образование комплексного соединения пептида PGPL с гепарином в чистой системе. Это соединение было получено с оптимальным молярным соотношением компонентов 1:1. Использование перекрестного электрофореза показало взаимодействие и возникновение химической связи между аминокислотными группами пептида PGPL и кислотными группами гепарина. Как видно на рис. 2, при перпендикулярном нанесении на носитель растворов гепарина и пептида PGPL и их последующей миграции в электрическом поле, наблюдалось исчезновение окраски на кислые карбоксильные и сульфатные группы гепарина (краситель Азур II) в месте встречи веществ.

Далее изучали гипогликемическое действие и влияние на систему гемостаза комплексного соединения PGPL-гепарин и его компонентов – пептида PGPL и гепарина в эквивалентных дозах в условиях стойкой ГГ у крыс.

Влияние комплексного соединения

PGPL-гепарина на уровень глюкозы крови

После индукции гипергликемии на 18-ые сутки эксперимента уровень глюкозы в крови крыс с ГГ (группа 1) был достоверно выше, чем у здорового контроля (группа 5) (6.25 ± 0.35 ммоль/л против 4.8 ± 0.25 ммоль/л соответственно; $P < 0.01$), что составило 130%. Введение комплексного соединения

PGPL-гепарин крысам снижало этот показатель на 21% (4.96 ± 0.23 ммоль/л; $P < 0.01$). Введение составных частей комплекса (PGPL или гепарина) оказывало более слабый гипогликемический эффект, что приводило к меньшему снижению уровня глюкозы в крови на 13 и 9% соответственно (до 5.41 ± 0.21 ммоль/л с PGPL и 5.71 ± 0.56 ммоль/л с гепарином; $P < 0.05$). На 28-й день эксперимента (через 6 дней после отмены лечения) уровень глюкозы в крови крыс группы 1 продолжал повышаться и составил 179% относительно здоровых животных (группа 5) (9.0 ± 0.42 ммоль/л против 5.02 ± 0.32 ммоль/л; $P < 0.01$). В то же время уровень глюкозы в крови крыс группы 2, получавших комплекс, составил 5.8 ± 0.72 ммоль/л ($P < 0.01$), тогда как введение и PGPL, так и гепарина не изменяли этот показатель ($P > 0.05$) (рис. 3).

Влияние комплексного соединения

PGPL-гепарин на антикоагулянтную активность плазмы крови по тесту АЧТВ

Как видно на рис. 4, на 18-й день эксперимента у крыс с ГГ (группа 1) антикоагулянтная активность плазмы крови составила 27.6 ± 6.32 с, т.е. была снижена на 29% по сравнению со здоровыми нормальными крысами ($P < 0.01$). Этот вывод подтверждает, что через 12 дней после индукции ГГ прокоагулянтная активность крови повышается в организме ГГ животных. У ГГ крыс антикоагулянтная активность после терапии комплексом и гепарином достоверно увеличивалась на 89 и 34%, соответственно (52.2 ± 7.58 с – группа 2; $P < 0.01$ и 37.0 ± 5.22 с – группа 4; $P < 0.05$), тогда как введение PGPL не изменяло антикоагулянтную активность плазмы крови крыс ($P > 0.05$).

На 28-й день эксперимента, т.е. через 6 дней после отмены введения препаратов антикоагулянтная активность крови достоверно отличалась от ГГ контроля (28.3 ± 3.52 с) только в группе 2 после применения комплекса PGPL-гепарин (44.9 ± 5.01 с; $P < 0.01$) на 58% (рис. 4). Введение составных частей комплекса (PGPL и гепарина) не приводило к достоверному изменению данного параметра ($P > 0.05$).

Влияние комплексного соединения

PGPL-гепарин на фибринолитическую активность (СФА, НФ, ФФ и ААП) плазмы крови

Показано, что у крыс с ГГ (группа 1) угнеталась фибринолитическая активность плазмы крови по сравнению со здоровыми животными группы 5 (табл. 1). Так, показатели СФА, НФ и ФФ у ГГ животных были снижены на 19, 28 и 32%, соответственно, по сравнению с таковыми у здоровых крыс ($P < 0.05$). Также у крыс группы 1 ААП была меньше на 36% по сравнению с крысами группы 5 ($P < 0.01$).

Таблица 1 – Фибринолитическая активность (мм²) плазмы крови животных на 22-й день (через 1 ч после 5-го введения препаратов) и на 28-й день эксперимента (через 6 дней после отмены введения препаратов)

Группы животных	СФА	НФ	ФФ	ААП
Через 1 ч после 5-го введения препаратов (22-й день)				
ГГ контроль (группа 1)	27.5 ± 5.05 ^{##}	16.7 ± 3.09 [#]	52.7 ± 11.3 [#]	17.8 ± 6.51 ^{##}
ГГ + комплекс (группа 2)	52.0 ± 10.1 ^{**##}	35.8 ± 6.29 ^{**#}	89.3 ± 8.54 ^{**#}	49.4 ± 10.1 ^{**##}
ГГ + PGPL (группа 3)	33.4 ± 6.24 [*]	21.8 ± 3.99	71.5 ± 5.25 [*]	24.1 ± 4.43 [*]
ГГ + гепарин (группа 4)	31.8 ± 4.78	19.4 ± 4.6	68.7 ± 7.48 [*]	27.3 ± 6.15 ^{**}
Здоровые (группа 5)	34.0 ± 5.98 ^{**}	23.1 ± 2.56 [*]	77.5 ± 12.4 [*]	28.0 ± 7.2 ^{**}
Через 6 дней после отмены введения (28-й день)				
ГГ контроль (группа 1)	28.7 ± 2.83 ^{##}	17.3 ± 3.4 ^{##}	37.1 ± 8.36 ^{##}	9.4 ± 3.61 [#]
ГГ + комплекс (группа 2)	38.7 ± 5.22 ^{**}	25.8 ± 2.86 ^{**}	60.6 ± 4.9 ^{**}	22.6 ± 4.38 ^{**}
ГГ + PGPL (группа 3)	32.2 ± 4.44	20.7 ± 3.74	45.2 ± 5.31 ^{*#}	15.7 ± 2.41 [*]
ГГ + гепарин (группа 4)	30.7 ± 6.27 [#]	22.8 ± 4.18	42.1 ± 6.06 ^{##}	12.5 ± 4.6
Здоровые (группа 5)	39.6 ± 4.33 ^{**}	25.0 ± 3.97 ^{**}	65.8 ± 5.05 ^{**}	19.0 ± 5.33 [*]

Примечание: * $P < 0.05$ и ** $P < 0.01$ – по сравнению с группой 1 (ГГ контроль), # $P < 0.05$ и ## $P < 0.01$ – по сравнению с группой 5 (здоровые крысы). Данные представлены как $M \pm SD$. СФА – суммарная фибринолитическая активность, НФ – неферментативная фибринолитическая активность, ФФ – ферментативная фибринолитическая активность, ААП – активность тканевого активатора плазминогена.

После интраназального введения комплекса PGPL-гепарин, пептида PGPL и гепарина фибринолитическая активность плазмы крови крыс со стойкой ГГ приводило к повышению фибринолиза всех типов (СФА, НФ, ФФ, ААП), но в разной степени. Так, у крыс группы 2, получавших комплекс, на 22-й день эксперимента эти показатели увеличились на 89, 115, 69 и 177% ($P < 0.01$), соответственно, по сравнению с ГГ контролем (группа 1). При этом параметры фибринолиза превышали значения у здоровых животных (группа 5). В то же время применение пептида приводило к достоверному возрастанию СФА на 21% ($P < 0.05$), ФФ – на 36% ($P < 0.05$) и ААП – на 35% ($P < 0.05$) в плазме крови крыс группы 3, но не изменяло НФ по сравнению с ГГ контролем ($P > 0.05$). Введение гепарина вызывало достоверное увеличение только ФФ – на 30% ($P < 0.05$) и ААП – на 53% ($P < 0.01$) у крыс группы 4 по сравнению с ГГ контролем.

На 28-й день эксперимента у крыс с ГГ (группа 1), сохранялся пониженный фон фибринолиза: СФА, НФ, ФФ ($P < 0.01$ во всех случаях) и ААП ($P < 0.05$) были достоверно ниже (на 27, 30, 44 и 51% соответственно), чем у здоровых животных (группа 5). В то же время в группе 2 даже после прекращения применения комплекса отмечалось статистически значимое повышение фибринолитической активности: СФА – на 35%, НФ – на 49%, ФФ – на 63% и ААП – на 140% по сравнению с ГГ контролем ($P < 0.01$). Эти показатели соответствовали значениям здорового контроля. Кроме того, в группе 3 (PGPL) наблюдалось достоверное повышение только ФФ (на 22%, $P < 0.05$) и ААП (на 67%, $P < 0.05$). В этих условиях в группе 4 после прекращения введения гепарина достоверных отличий показателей фибринолитической активности по сравнению с ГГ контролем не выявлено ($P > 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что прогрессирование сахарного диабета сопровождается подавлением ингибирования инсулярной [15] и противосвертывающей систем. Депрессия ПСС характеризуется усиленной агрегацией тромбоцитов, сниженной антикоагулянтной и фибринолитической активностью плазменного гемостаза, что приводит к повышению тромбогенного потенциала крови, а также часто вызывает образование тромбов [8].

По данным литературы у ГГ крыс подавление функции ПСС сопровождается повышением свертываемости крови, снижением фибринолиза и значительным возрастанием уровня глюкозы крови [3, 4, 13]. Подобный эффект наблюдался и в нашей модели экспериментальной гипергликемии.

В данном исследовании оценивалось влияние комплексного соединения PGPL-гепарин и его компонентов – гепарина и пептида PGPL на гемостатическую и инсулярную системы ГГ крыс. Показано, что в ситуации, когда развивалась стойкая гипергликемия, комплекс PGPL-гепарин оказывал защитное действие на функциональное состояние и инсулярной, и гемостатической систем организма, что нами выявлено впервые.

Как пептид PGPL, так и гепарин в дозах, эквивалентных их содержанию в комплексе, стимулировали антикоагулянтно-фибринолитический фон крови и снижали уровень глюкозы. Установлено, что противосвертывающие эффекты комплекса превышали действие его составных частей: в плазме крови повышались СФА (в результате активации НФ и тканевого активатора плазминогена) и антикоагулянтная активность крови. Кроме того, действие комплекса PGPL-гепарин было пролонгированным, поскольку сохранялось и через 6 дней после окончания его применения.

Ранее действие пептидов PG, PGP и RGP, гепарина и их комплексных соединений оценивали у здоровых и гипергликемических крыс. У крыс, интраназально получавших гепарин, повышалась только антикоагулянтная активность, а при введении пептидов – усиливались и антикоагулянтные, и фибринолитические свойства крови [12, 13, 16]. Многократное интраназальное введение пептида PGPL в большей дозе (1 мг/кг), чем в настоящей работе, крысам со стойкой ГГ защищало организм от развития гиперкоагуляции. При этом наблюдалось увеличение суммарного и неферментативного фибринолиза крови животных. Положительные изменения в инсулярной и противосвертывающей системах наблюдались в течение 5 дней после окончания применения пептида [9].

Рассматривая механизм действия комплекса на нормализацию уровня глюкозы крови, можно предположить, что PGPL-гепарин оказывал данный эффект и предотвращал развитие СД2 вследствие наличия в его структуре аминокислоты лейцин, которая стимулирует выработку инсулина, обеспечивая нормогликемическое действие [6].

Механизм антикоагулянтного действия гепарина обусловлен блокадой активности тромбина и других коагулянтных белков [17]. В то же время гепарин усиливал активность тканевого активатора плазминогена, что и приводило к усилению ферментативного фибринолиза [10].

Некоторые пептиды являются эффективными ингибиторами тромбина, которые обладают антикоагулянтными свойствами, могут активировать ферментативный фибринолиз и предотвращать образование тромбов в кровотоке. Было установлено, что пролин и глицинсодержащие пептиды PG и PGP могут индуцировать растворение нестабилизированного фибрина [16]. Наличие рецепторов глипролина на эндотелии пока не установлено, но сообщалось о существовании специфических сайтов связывания

PGPL на цитоплазматической мембране базальных ядер головного мозга крыс [18]. Возможно, этот пептид, вводимый интраназальным путем, проходит через гематоэнцефалический барьер, проникая в структуры головного мозга и оказывая свое действие через специфические рецепторы. По данным литературы [19, 20], как и по результатам настоящего исследования, отдельные пептиды способны оказывать гипогликемический эффект и препятствовать прогрессированию СД2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованный нами комплекс PGPL-гепарин усиливал гипогликемическое и антикоагулянтное действие входящих в его состав компонентов – гепарина и пептида благодаря своим структурным особенностям. Он предотвращал образование фибрина за счет наличия у него фибриндеполимеризационной активности, проявлял антикоагулянтную активность, обусловленную его ингибирующим действием на активность тромбина. Появление как PGPL, так и комплекса в кровотоке стимулирует высвобождение тканевого активатора плазминогена из сосудистого эндотелия, что приводит к повышению ферментативных фибринолитических свойств крови, причем действие комплекса оказывается более эффективным. Также показано, что комплекс в значительной степени улучшает функционирование инсулярной системы у гипергликемических крыс, а его составная часть – гепарин модулирует функцию антикоагулянтной системы, участвуя в предотвращении процесса гиперкоагуляции, сопровождающей развитие СД2.

В перспективе полученные нами результаты на модели крыс со стойкой гипергликемией могут быть применимы в клинической практике для пациентов с сахарным диабетом 2 типа, которые предрасположены к развитию тромботических осложнений.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Это исследование не получило какого-либо конкретного гранта от финансирующих учреждений в государственном, коммерческом или некоммерческом секторах.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Blair M. Diabetes mellitus review // Urol. Nurs. 2016. Vol. 36. P. 27–36.
2. Ahrén B., Schweizer A., Dejager S., Dunning B.E., Nilsson P.M., Persson M., Foley J.E. Vildagliptin enhances islet responsiveness to both hyper- and hypoglycemia in patients with type 2 diabetes // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2009. Vol. 94. P. 1236–1243.
3. Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ляпина Л.А., Ульянов А.М., Шубина Т.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е., Григорьева М.Е. Изучение сочетанного антидиабетогенного и противосвертывающего действия трипептида Gly-Pro-Arg на модели развития стойкой гипергликемии у крыс // Докл. Акад. Наук 2011. Т. 438. №2. С. 275–278.
4. Шубина Т.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ляпина Л.А., Ульянов А.М., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е. Антикоагулянтно-фибринолитическая и гипогликемическая

- активность тетрапептида ARG-PRO-GLY-PRO // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2012. Т. 153. № 3. С. 304–307.
5. Mulukutla S.N., Hsu J.W., Gaba R., Bohren K.M., Guthikonda A., Iyer D., Ajami N.J., Petrosino J.F., Hampe C.S., Ram N., Jahoor F., Balasubramanyam A. Arginin metabolism is altered in adults with α - β + ketosis-prone diabetes // J. Nutr. 2018. Vol.148. № 2. P. 185–193. doi: 10.1093/jn/nxx032.
 6. Brunetta S.H., de Camargo C.Q., Nunes E.A. Does L-leucine supplementation cause any effect on glucose homeostasis in rodent models of glucose intolerance? A systematic review // Amino Acids 2018. Vol. 15. P. 1663–1678. Doi: 10.1007/s00726-018-2658-8.
 7. Golla K.I., Stavropoulos D., Shields D.S., Moran N.R. Peptides derived from cadherin juxta membrane region inhibit platelet function // Soc. Open Sci. 2018. Vol. 5. Doi:10.1098/rsos.172347.
 8. Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ляпина Л.А., Шубина Т.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю. Коррекция нарушений противосвертывающей и инсулярной систем организма пептидом Leu-Pro-Gly-Pro // Изв. РАН Сер. биол. 2013. № 3. С. 341–344.
 9. Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Пасторова В.Е. Участие пептида Pro-Gly-Pro-Leu в восстановлении функций противосвертывающей и инсулярной систем организма при развитии стойкой гипергликемии у крыс // Вopr. биол. и фармац. хим. 2013. №4. С. 38–42.
 10. Aster R.H. Heparin-induced immune thrombocytopenia – a clinical or laboratory diagnosis? // J. Thromb. Haemost. 2006. Vol. 4. P. 757–758.
 11. Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е. Регуляторная роль соединений гепарина с низкомолекулярными лигандами крови в плазменном и тромбоцитарном гемостазе // Изв. РАН Сер. Биол. 2011. № 2. С. 208–219.
 12. Смолина Т.Ю., Пасторова В.Е., Ляпина Л.А. Комплексобразование дипептида пролил-глицин с гепарином: исследование гемостатических свойств комплекса in vitro при внутривенном введении // Тромбоз, гемостаз и реология. 2002. № 2. С. 38–41.
 13. Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Григорьева М.Е., Пасторова В.Е. Комплекс гепарина с пептидом Arg-Pro-Gly-Pro и его антикоагулянтно-фибринолитические и гипогликемические эффекты // Изв. РАН Сер. биол. 2012. № 1. С. 72–77.
 14. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.: ООО «Авансесд солишын». 2012. 159 стр.
 15. Dedov I.I., Shestakova M.V., Shestakova O.Y. Innovation in the treatment of type 2 diabetes mellitus: use of incretins // Ter. Arkh. 2010. Vol. 82. P. 5–10.
 16. Lyapina L.A., Pastorova V.E., G.E. Samonina G.E., Ashmarin I.P. The effect of prolyl-glycyl-proline (PGP) peptide and PGP-rich substances on haemostatic parameters of rat blood // Blood Coagul. and Fibrinol. 2000. Vol. 11 P. 409–414.
 17. Stief T.W. Inhibition of thrombin in plasma by heparin or arginine // Clin. Appl. Thromb. Hemost. 2007. Vol. 13 P. 146–153.
 18. Myasoedov N.F., Rochev D.L., Lyapina L.A., Obergan T.Y., Andreeva L.A. Leucine-containing glyprolines (Pro-Gly-Pro-Leu and Leu-Pro-Gly-Pro): participation in hemostatic reactions in vitro and in vivo in rats with blood coagulation and lipid metabolism disorders // Dokl. Biol. Sci. 2013. Vol. 453. P. 345–348.
 19. Valencia-Mejia E., Batista K.A., Fernandes J.J.A., Fernandes K.F. Antihyperglycemic and hypoglycemic activity of naturally occurring peptides and protein hydrolysates from easy-to-cook and hard-to-cook beans (*Phaseolus vulgaris*) // Food Res. Int. 2019. Vol. 121. P. 238–246. Doi: 10.1016/j.foodres.2019.03.043.
 20. Kvapil M. Strategy and tactics of treatment of type 2 diabetes mellitus // Vnitr. Lek. 2019. Vol. 65. № 4. P. 273–278.

АВТОРЫ

Оберган Тамара Юрьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. ORCID 0000-0002-3760-3943. E-mail: tobergan@mail.ru.

Мясоедов Николай Федорович – доктор химических наук, академик РАН, руководитель отдела Института молекулярной генетики РАН. ORCID 0000-0001-5927-3810. E-mail: nfm@img.ras.ru

Григорьева Марина Евгеньевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. ORCID 0000-0003-0469-3943. E-mail: mgrigorieva@mail.ru

Ляпина Людмила Анисимовна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. ORCID 0000-0002-8983-652X. E-mail: lyapinal@mail.ru

Шубина Татьяна Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. ORCID 0000-0003-1092-8382. E-mail: shubina@mail.ru .

Андреева Людмила Александровна – заведующий сектором Института молекулярной генетики РАН. ORCID 0000-0003-3291-8994, 0000-0003-4718-5033. E-mail: landr@img.ras.ru

