

2020 Том / Volume VIII

№ 2

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 8, Выпуск 2, 2020

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. Волгоград, 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 Ивона 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, 2020
© Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, 2020
© Авторы, 2020

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, Volgograd, 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, 2020

© Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –
branch of Volgograd State Medical University, 2020

©Authors, 2020

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS**Оригинальные статьи / Research Article****Фармакология и клиническая фармакология / Pharmacology and Clinical Pharmacology**

<i>Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Гайдукова К.А., Черников М.В., Жуковская О.Н.</i>	<i>Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Gaidukova K.A., Chernikov M.V., Zhukovskaya O.N.</i>
АНТИТРОМБОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА, ИМЕЮЩЕГО В СВОЕЙ СТРУКТУРЕ ПРОСТРАНСТВЕННО ЗАТРУДНЕННЫЙ ФЕНОЛЬНЫЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬ 78	ANTITROMBOTIC ACTIVITY OF A NEW BENZIMIDAZOLE DERIVATIVE WITH A SPATIALLY DIFFICULT PHENOLIC SUBSTITUTE IN ITS STRUCTURE 78
<i>Калашников А.В., Воробьев А.А., Калашникова С.А., Салимов Д.Ш.</i>	<i>Kalashnikov A.V., Vorobiev A.A., Kalashnikova S.A., Salimov D.Sh.</i>
КОМПЛЕКСНАЯ БИОСТИМУЛЯЦИЯ ВНУТРИПЛЕВРАЛЬНОГО АДГЕЗИОГЕНЕЗА В ТОРАКАЛЬНОЙ ХИРУРГИИ 86	COMPLEX BIOSTIMULATION OF INTRAPLEURAL ADHESIOGENESIS IN THORACAL SURGERY 86
<i>Пученкова О.А., Надеждин С.В., Жученко М.А., Солдатов В.О., Кубекина М.В., Коршунова Д.С., Коршунов Е.Н., Корокина Л.В., Голубинская П.А., Куликов А.Л., Гуреев В.В., Покровский В.М., Патраханов Е.А., Лебедев П.Р., Денисюк Т.А., Беляева В.С., Мовчан Е.А., Лепетуха Е.И., Покровский М.В.</i>	<i>Puchenkova O.A., Nadezhdin S.V., Zhuchenko M.A., Soldatov V.O., Kubekina M.V., Korshunova D.S., Korshunov E.N., Korokina L.V., Golubinskaya P.A., Kulikov A.L., Gureev V.V., Pokrovskiy V.M., Patrakhanov E.A., Lebedev P.R., Denisjuk T.A., Belyaeva V.S., Movchan E.A., Lepetukha E.I., Pokrovskiy M.V.</i>
ИЗУЧЕНИЕ АНТИАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОЙ И ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДНЫХ АГОНИСТОВ ГЕТЕРОРЕЦЕПТОРА EPOR/CD131 100	STUDY OF ANTIATHEROSCLEROTIC AND ENDOTHELIOPROTECTIVE ACTIVITY OF PEPTIDE AGONISTS OF EPOR/CD131 HETERORECEPTOR 100

Информационные технологии в фармации / Informational Technologies in Pharmacy

<i>Э.Т. Оганесян, С.С. Шатохин</i>	<i>E.T. Oganesyanyan, S.S. Shatokhin</i>
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ (НО·) АКТИВНОСТИ РОДСТВЕННЫХ СТРУКТУР, СОДЕРЖАЩИХ ЦИННАМОИЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ. II. ПРОИЗВОДНЫЕ 2',4'-ДИГИДРОКСИХАЛКОНА, А ТАКЖЕ ФЛАВАНОНА И ФЛАВОНА, СОДЕРЖАЩИЕ ГИДРОКСИГРУППУ В ПОЛОЖЕНИИ 7 112	USING QUANTUM-CHEMICAL PARAMETERS FOR PREDICTING ANTI-RADICAL (HO·) ACTIVITY OF RELATED STRUCTURES CONTAINING A CINNAMOYL FRAGMENT II. DERIVATIVES OF 2',4'-DIHYDROXYCHALCONE, FLAVANONE AND FLAVONE, CONTAINING A HYDROXY GROUP I N POSITION 7 112

Обзоры, лекции / Reviews, Lectures

<i>Кищенко В.М., Верниковский В.В., Привалов И.М., Шевченко А.М.</i>	<i>Kishchenko V.M., Vernikovskiy V.V., Privalov I.M., Shevchenko A.M.</i>
ПЛЕНКИ В РОССИЙСКОЙ МЕДИЦИНЕ И КОСМЕТОЛОГИИ: ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ, ТЕХНОЛОГИЯ 124	FILMS IN RUSSIAN MEDICINE AND COSMETOLOGY: DEVELOPMENT HISTORY, CLASSIFICATION, TECHNOLOGY 124
<i>Орлова А.А., Повыдыш М.Н.</i>	<i>Orlova A.A., Povydysh M.N.</i>
ХИМИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ GEUM RIVALE L. И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 133	CHEMICAL CONSTITUENTS OF GEUM RIVALE L. AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY 133

УДК 615.017:615.22:6167-08-035



АНТИТРОМБОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА, ИМЕЮЩЕГО В СВОЕЙ СТРУКТУРЕ ПРОСТРАНСТВЕННО ЗАТРУДНЕННЫЙ ФЕНОЛЬНЫЙ ЗАМЕСТИТЕЛЬ

Спасов А.А.¹, Кучерявенко А.Ф.¹, Гайдукова К.А.¹, Черников М.В.², Жуковская О.Н.³¹ Волгоградский государственный медицинский университет
400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1² Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России
357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11³ НИИ физической и органической химии Южного федерального университета
344090, г. Ростов-на-Дону, пр. Стачки, 194/2

E-mail: aspasov@mail.ru

Получено 10.02.2020

Рецензия (1) 10.04.2020

Рецензия (2) 20.04.2020

Принята к печати 28.04.2020

Цель – изучение антитромбогенных свойств соединения РУ-1144 с ранее выявленной выраженной антиагрегантной и антиоксидантной активностью, на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного хлоридом железа (III), в сравнении с известными антиагрегантными препаратами – ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом, а также антиоксидантным препаратом – этилметилгидроксипиридина сукцинат.

Материалы и методы. Антитромботическая активность соединения РУ-1144 была изучена на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, вызванного аппликацией 50% хлорида железа (III) и модели Global Thrombosis Test (по Горогу). Оценку данного вида активности производили по удлинению времени образования тромба. Исследования влияния соединения РУ-1144 на параметр времени кровотечения проводили на мышах. В качестве препаратов сравнения использовали ацетилсалициловую кислоту, клопидогрел и ЭМГПС.

Результаты. Выявленное на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией хлорида железа (III), антитромботическое действие субстанции РУ-1144, превосходило таковое как у ацетилсалициловой кислоты, так и у клопидогрела в 3,5 раза, и в 2,9 раза – у ЭМГПС. На модели Global Thrombosis Test (тест Горога) *in vitro* соединение РУ-1144 снижало тромбогенный потенциал крови в равной степени с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом. При оценивании «времени кровотечения» вещество РУ-1144 пролонгировало кровотечение в среднем в 2 раза менее выражено чем АСК и клопидогрел.

Заключение. Проведенные исследования продемонстрировали у соединения РУ-1144 выраженную антитромботическую активность, превышающую таковую у ацетилсалициловой кислоты, клопидогрела и ЭМГПС, при этом способность удлинять время кровотечения была достоверно ниже, чем у препаратов сравнения.

Ключевые слова: антитромботическая активность, тромбоз, бензимидазол, АСК, клопидогрел, этилметилгидроксипиридина сукцинат, тромбоз по Горогу, время кровотечения

Сокращения: ЭМГПС – этилметилгидроксипиридина сукцинат; АСК – ацетилсалициловая кислота.

ANTITROMBOTIC ACTIVITY OF A NEW BENZIMIDAZOLE DERIVATIVE WITH A SPATIALLY DIFFICULT PHENOLIC SUBSTITUTE IN ITS STRUCTURE

Spasov A.A.¹, Kucheryavenko A.F.¹, Gaidukova K.A.¹, Chernikov M.V.², Zhukovskaya O.N.³¹ Volgograd State Medical University
1, Pavshikh Bortsov Square, Volgograd, Russia 400131² Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State
Medical University, 11, Kalinin av., Pyatigorsk, Russia 357532³ Research Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University
194, Bldg 2, Stachki Av., Rostov-on-Don, Russia 344090

E-mail: aspasov@mail.ru

Received 10 February 2020

Review (1) 10 April 2020

Review (2) 20 April 2020

Accepted 28 April 2020

Для цитирования: Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Гайдукова К.А., Черников М.В., Жуковская О.Н. Антитромботическая активность нового производного бензимидазола, имеющего в своей структуре пространственно затрудненный фенольный заместитель. *Фармация и фармакология*. 2020;8(2):78-85. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-78-85

© Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Гайдукова К.А., Черников М.В., Жуковская О.Н., 2020

For citation: Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Gaidukova K.A., Chernikov M.V., Zhukovskaya O.N. Antitrombotic activity of a new benzimidazole derivative with a spatially difficult phenolic substitute in its structure. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(2):78-85. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-78-85

The aim of the study was to investigate antithrombogenic properties of compound RU-1144 with previously identified pronounced antiplatelet and antioxidant activities. The thrombosis induced by *Ferric chloride* (FeCl_3) was carried out in rats' carotid artery, in comparison with the known antiaggregant drugs – acetylsalicylic acid (ASA) and clopidogrel, as well as with the antioxidant preparation – ethylmethylhydroxypyridine succinate (EMHPS).

Materials and methods. The antithrombotic activity of compound RU-1144 was studied on the model of the rats with carotid artery thrombosis, induced by the application of 50% *ferric chloride* (FeCl_3), and the Global Thrombosis Test model (the *Görög Thrombosis Test*). The evaluation of this type of activity was carried out by prolonging the time of a blood clot formation. The studies of the compound RU-1144 effect on the bleeding time parameter were performed in mice. Acetylsalicylic acid, clopidogrel and EMHPS were used as reference drugs.

Results. The antithrombotic effect of the RU-1144 substance revealed in the model of arterial thrombosis induced by the application of *ferric chloride* (FeCl_3), exceeded that of both acetylsalicylic acid and clopidogrel by 3.5 times and that of EMHPS by 2.9 times. In the model of the *in vitro* Global Thrombosis Test (the *Görög Thrombosis Test*), compound RU-1144 reduced the thrombogenic potential of the blood equally with acetylsalicylic acid and clopidogrel. The assessment of "the bleeding time", caused by the RU-1144 substance, showed that the prolongation of bleeding was twice as less pronounced than that caused by ASA and clopidogrel.

Conclusion. The performed studies demonstrated a pronounced antithrombotic activity of compound RU-1144, which exceeded that of acetylsalicylic acid, clopidogrel and EMHPS, while the ability to prolong the bleeding time was reliably lower than that of reference drugs.

Keywords: antithrombotic activity, thrombosis, benzimidazole, ASA, clopidogrel, ethylmethylhydroxypyridine succinate, the *Görög Thrombosis Test*, bleeding time

Abbreviations: EMHPS – ethylmethylhydroxypyridine succinate; ASA – acetylsalicylic acid.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания на данный момент являются ведущей причиной глобальной инвалидизации и смертности во всем мире [1–3]. По данным Всемирной организации здравоохранения к 2030 году будет зарегистрировано более 20 миллионов смертей в год от заболеваний, связанных с повышением тромбогенного потенциала крови. Среди них - ишемическая болезнь сердца, инсульт, нарушение периферического кровообращения, осложнения сахарного диабета и др., поэтому антиагрегантная терапия является важной составляющей в различных областях клинической практики [4].

Известно, что атеросклеротическая бляшка приводит к неравномерному сужению участка сосуда и, в результате этого, при прохождении потока крови через это место возникают турбулентные ускорения, влияющие в свою очередь на форменные элементы крови, прежде всего эритроциты и тромбоциты, повышая их агрегационную способность. Помимо форменных элементов, воздействию подвергается стенка сосуда, что выражается в повреждении эндотелия, возникновении возможности контакта коллагеновых волокон с тромбоцитами с последующей их адгезией на поврежденной поверхности, активацией, агрегацией и образованием тромба [5].

Таким образом, активация тромбоцитарного звена гемостаза может стать причиной осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы, а именно возникновения артериальных тромбозов [1]. Кроме того, важная роль в патогенезе тромбообразования отводится активации процессов перекисного окисления липидов, усиление которой приводит к повышению процессов агрегации тромбоцитов и коагуляционного звена гемостаза [6, 10]. Данная концепция является теоретическим обоснованием использования антиоксидантных средств, в качестве допол-

нительной патогенетической терапии артериальных тромбозов. Таким образом, проведение своевременных и правильных профилактических мероприятий, направленных на ингибирование процессов агрегации тромбоцитов и перекисного окисления липидов, может предотвращать преждевременную смерть, увеличивать продолжительность жизни, улучшать ее качество, а также снижать экономические затраты общества на лечение и реабилитацию [7–9].

В ходе ранее проведенных исследований, среди гетероциклических соединений были выявлены вещества, проявляющие антиагрегантные и антиоксидантные свойства [11–13]. Соединение под шифром RU-1144 (1-(2,6-дитретбутил-4-(1-гидроксиэтил)-фенил-пиримидобензимидазолгидрохлорид), способно ингибировать процессы агрегации тромбоцитов и перекисного окисления липидов, превосходя препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту, клопидогрел и этилметилгидроксипиридина сукцинат [31]. Существуют различные методы исследования данных видов активности [15, 16]. Однако наиболее распространенным является изучение антитромботических свойств на моделях артериальных тромбозов.

Поэтому, целью нашего исследования явилось сравнительное изучение антитромботической активности соединения RU-1144 и антиагрегантных препаратов с высокой доказательной базой ацетилсалициловой кислоты и клопидогрела, а также антиоксидантного средства ЭМГПС на модели артериального тромбоза сонной артерии крысы, а также на модели Global Thrombosis Test (по Горюгу) и влияние на параметр «время кровотока».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Эксперименты выполнены на 108 белых нелинейных крысах-самцах массой 250–300 г и 24 белых беспо-

родных мышах-самцах, массой 20–22 г, содержащихся в условиях вивария (температура 22–24°C, относительная влажность воздуха 40–50%) с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92). Все животные получены из питомника ООО «НИЦБМТ». Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Все животные подвергались карантину в течение 14 дней (крысы и мыши) в условиях отдельных боксов вивария ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. В течение карантина, не менее чем 2 раза (1 и 14 день у крыс и мышей) проводилось измерение массы тела животных. Ежедневно проводили контроль клинического состояния путем визуального осмотра в группах. Животные с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями были исключены из экспериментальных групп. Все процедуры с животными в исследовании проводились в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986) и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). Все процедуры с животными проводились в соответствии со стандартами, изложенными в восьмом издании руководства по уходу и использованию лабораторных животных и ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments). Экспериментальное исследование одобрено Региональным Исследовательским Этическим Комитетом Волгоградской области протокол № 2083-2016 от 18.11.2016 г. Данное исследование выполнено в соответствии с требованиями «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [15].

Дизайн исследования

Проведено экспериментальное исследование антитромботической активности производного бензимидазола под шифром РУ-1144 (1-(2,6-дитретбутил-4-(1-гидроксиэтил)-фенил-пиримидобензимидазол гидрохлорид) (НИИ ФОХ ЮФУ), имеющего в своей структуре пространственно затрудненный фенольный заместитель. В качестве препаратов сравнения были выбраны известные антиагрегантные средства с высокой доказательной активностью—ацетилсалициловая кислота («Sigma», США) и клопидогрел («Sapofi», Франция), а также антиоксидантное средство—этилметилгидроксипиридина сукцинат («ЭМГПС», ООО «Фармасофт», Россия) [16]. Соединение РУ-1144 и препараты сравнения вводились внутривенно с помощью интрагастрального зонда.

В качестве растворителя веществ использовали очищенную дистиллированную воду. Антитромботическую активность соединения РУ-1144 и препаратов сравнения изучали на модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, вызванного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III). Исследуемые вещества вводили крысам однократно внутривенно за 2 часа до нанесения тромботического агента на сонную артерию животных [17]. За 30 минут до начала воспроизведения экспериментального артериального тромбоза крыс внутривенно наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг). После наступления наркоза послойно вскрывали кожу и ткани, выделяя сонную артерию. На небольшом участке сонной артерии укладывали ватный диск, смоченный 50% раствором хлорида железа (III) (0,025 мл). При помощи специальной пленки «Parafilm» изолировали окружающие ткани. Для регистрации изменений кровотока использовали ультразвуковой доплерограф «Минимакс-Допплер-К» («Минимакс», Санкт-Петербург). Ультразвуковой датчик аппарата устанавливали на небольшом расстоянии от ватного диска, наложенного на сонную артерию. Регистрацию кровотока проводили до полной окклюзии сосуда.

Соединение РУ-1144 и препараты сравнения были изучены в дозах эквимоларных дозе 19 мг/кг ацетилсалициловой кислоты (фармакологически активная доза, полученная на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов крыс в тесте *in vivo*). Для исследуемого вещества РУ-1144 эта доза составила 48 мг/кг, а для препаратов сравнения клопидогрела и ЭМГПС – 32 и 28 мг/кг соответственно). В зависимости от проявленного антитромботического эффекта с целью определения ED₅₀ (доза, в которой изученные соединения увеличивают время наступления полной окклюзии сосуда тромбом по отношению к контролю на 50%), исследуемые дозы веществ и препаратов сравнения либо увеличивались, либо уменьшались. Соединение РУ-1144 было также изучено в дозах 24 и 12 мг/кг, АСК – 100 и 150 мг/кг, клопидогрел – 60; 120 и 180 мг/кг, а препарат сравнения ЭМГПС исследовался в дозах, которые составили 150 и 100 мг/кг, соответственно.

Антитромботическую активность соединения РУ-1144 исследовали на модели Global Thrombosis Test *in vitro* с исследованием биологического материала *ex vivo* после однократного внутривенного введения в дозе 18,8 мг/кг (фармакологически активная доза, полученная на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов крыс в тесте *in vivo*) [18]. Препараты сравнения ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел исследовали в дозах 28,5 и 13,8 мг/кг соответственно. Через 2 часа после введения исследуемых соединений осуществляли забор крови из брюшной аорты шприцем в объеме 5 мл, содержащим 20 мкМ индуктора агрегации тромбоцитов АДФ.

Животных предварительно наркотизировали хлоралгидратом (внутрибрюшинно – 400 мг/кг). Полученную кровь немедленно помещали в специальную пробирку Горога без добавления стабилизаторов и консервантов. Основными критериями оценки антитромботического действия тестируемого соединения и препаратов сравнения служили показатели времени окклюзии и времени лизиса, анализ которых осуществляли при помощи программного обеспечения GTT Draw 2.3.

С целью определения нежелательного эффекта антиагрегантных препаратов была использована модель «время кровотечения на мышах» [19]. Для воспроизведения данной модели предварительно проводили наркотизацию животных, используя хлоралгидрат в дозировке 400 мг/кг, после чего отсекали 5 мм кончика хвоста, который помещали в пробирку с физиологическим раствором, находящейся на водяной бане (37°C). Для оценки эффекта регистрировали время, выраженное в секундах, от момента отсека кончика хвоста до момента полной остановки кровотечения. По действию на данный параметр соединения РУ-1144 было изучено в дозе 18,8 мг/кг, а препараты сравнения АСК и клопидогрел в дозах 28,5 и 13,8 мг/кг соответственно. Введение исследуемых соединений осуществляли за 2 часа до начала эксперимента.

Группы контрольных животных получали очищенную дистиллированную воду внутрижелудочно однократно в эквивалентном объеме.

Статистическая обработка результатов

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием критерия Манна-Уитни, критерия one-way ANOVA с поправкой Бонферрони при помощи пакета статистических программ GraphPad Prism5.0. («GraphPad», США) и Microsoft Excel 2007 (Microsoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В ходе исследования на модели артериального тромбоза, были получены данные, свидетельствующие о наличии антитромботических свойств исследуемого вещества и препаратов сравнения.

Среднее время окклюзии сонной артерии животных контрольной группы составило $19,4 \pm 1,5$ мин. (табл. 1), что согласуется с литературными данными [23, 26].

Соединение РУ-1144, в дозе равной 48 мг/кг достоверно пролонгировало время полной окклюзии сонной артерии до 31,4 мин., что на 61,1% достоверно превосходило данный показатель контрольной группы животных. При дальнейшем снижении дозы тестируемого соединения до 24 мг/кг время образования тромба также достоверно уменьшалось и составляло 27 мин. Дальнейшее уменьшение дозы до 12 мг/кг достоверно пролонгировало насту-

пление полной окклюзии сонной артерии на 14,1% (табл. 1).

АСК в дозе 19 мг/кг недостоверно по отношению к контролю пролонгировала время образования тромба на 6,4%. Поэтому в дальнейшем исследовании дозы ацетилсалициловой кислоты были повышены до 100 и 150 мг/кг. При этом, в дозе 100 мг/кг препарат сравнения увеличивал время наступления полной окклюзии сонной артерии на 29,5%, а в дозе 150 мг/кг – на 58,5%. Таким образом, повышение дозы ацетилсалициловой кислоты увеличивало исследуемый показатель на 58,5% (табл. 1).

Клопидогрел в дозе 32 мг/кг достоверно удлин timer время тромбообразования на 9,0% по сравнению с группой контрольных животных. Дальнейшее увеличение дозы до 60 мг/кг, а затем до 120 и 180 мг/кг, приводило к увеличению времени до полной окклюзии сонной артерии на 21,8, 34,6 и 65,4%, соответственно (табл. 1).

ЭМГПС в дозе 28 мг/кг увеличивал время наступления полной окклюзии сонной артерии крыс на 8,11%. Повышение дозы препарата до 100 и 150 мг/кг приводило к удлин timer данный показатель на 41,03 и 75,21% соответственно.

Исходя из полученных данных, были рассчитаны ED_{50} антитромботической активности соединения РУ-1144 и препаратов сравнения. Так, для тестируемого образца РУ-1144 данная величина составила 37,8 мг/кг, для ацетилсалициловой кислоты – 133,0 мг/кг, а для клопидогрела и ЭМГПС – 132,0 и 108,4 мг/кг, соответственно. Таким образом, по показателю ED_{50} антитромботической активности соединения РУ-1144 превосходило антиагрегантные препараты ацетилсалициловую кислоту и клопидогрел в 3,52 и 3,49 раза соответственно, а антиоксидантное средство ЭМГПС – в 2,87 раза.

На следующем этапе была исследована антитромботическая активность соединения РУ-1144 и препаратов сравнения АСК и клопидогрела на модели Global Thrombosis Test (по Горюгу). При выполнении данного эксперимента в контрольной группе животных время наступления полной окклюзии в тест системе составило 95,2 с. (табл. 2). Исследование биологического материала животных, которым внутрижелудочно вводили соединение РУ-1144, показало статистически достоверное увеличение времени наступления полной окклюзии на 37% по сравнению со значениями, полученными в контрольной группе и составило 130,5 с. При этом исследуемое соединение недостоверно увеличивало время лизиса относительной контроля (табл. 2).

Референсный препарат – АСК, изученная в дозе 28,5 мг/кг, также достоверно приводила к пролонгированию времени наступления полной окклюзии в тест системе, при этом данный показатель в 1,2 раза превышал показатель контрольной группы животных, при этом не влияла на время лизиса сгустка.

Таблица 1 – Влияние соединения РУ-1144, АСК, клопидогрела и ЭМГПС на время полной окклюзии сонной артерии крыс на модели артериального тромбоза, индуцированного аппликацией хлорида железа (III) ($M \pm m$) (n=6)

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время образования тромба, мин.	Δ% пролонгирования времени образования тромба	ED ₅₀ , мг/кг
1	Контроль		19,4±1,5		
2	РУ-1144	12	22,3±0,7*	14,1±3,6*	37,8
		24	27,0±0,6*	38,5±2,8*	
		48	31,4±1,0*	61,1±5,4*	
3	АСК	19	20,8±0,3*	6,4±1,6*	133,0
		100	25,3±0,5*	29,5±2,5*	
		150	30,9±0,3*	58,5±1,4*	
4	Клопидогрел	32	21,3±0,3*	9,0±1,3*	132,0
		60	23,8±0,3*	21,8±1,6*	
		120	25,8±0,4*	34,6±1,3*	
		180	32,3±0,4*	65,4±2,2*	
5	ЭМГПС	28	21,1±0,3*	8,1±1,6*	108,4
		100	27,5±0,6*	41,0±2,9*	
		150	34,2±0,8*	75,2±4,3*	

Примечания:

n – число животных в группе

* – данные достоверны по отношению к контролю (критерий Манна-Уитни, $p \leq 0,05$)**Таблица 2 – Антитромботическая активность соединения РУ-1144 и препаратов сравнения АСК и клопидогрела на модели Global Thrombosis Test (по Горю) *ex vivo* ($M \pm m$, n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время окклюзии, с	Время лизиса, с
1	Контроль	–	95,2±1,4	635,2±29,0
2	РУ-1144	18,8	130,5±7,8*	711,2±39,4
3	Ацетилсалициловая кислота	28,5	117,5±4,1*	629,3±15,7
4	Клопидогрел	13,8	150,0±4,0*	631,5±17,1

Примечания:

n – число животных в группе

* – данные достоверны относительно контроля, критерий Манна-Уитни ($p < 0,05$)**Таблица 3 – Влияние соединения РУ-1144, АСК и клопидогрела на время кровотечения из хвостовой вены мышей, в дозах ED₅₀ антиагрегантной активности *in vivo* ($M \pm m$) (n=6)**

№ п/п	Тестируемые образцы	Доза, мг/кг	Время кровотечения, с	Δ% пролонгирования времени кровотечения
1	Контроль		349,3±7,2	
2	РУ-1144	18,8	445,5±10,5*#	27,5±3,0*#
3	АСК	28,5	583,9±9,1*	67,2±2,6*
4	Клопидогрел	13,8	566,0±10,0*	62,0±2,9*

Примечания:

n – число животных в группе

* – данные достоверны по отношению к контролю, критерий one-wayANOVA с поправкой Бонферрони ($p < 0,05$)# – данные достоверны по отношению к препаратам сравнения, критерий one-wayANOVA с поправкой Бонферрони ($p < 0,05$)**Таблица 4 – Антиагрегантная активность соединения РУ-1144 и препаратов сравнения в исследованиях *in vitro* (IC₅₀) и *in vivo* (ED₅₀)**

№ п/п	Тестируемые образцы	IC ₅₀ , мкМ	ED ₅₀ , мг/кг
1	РУ-1144	5,5	18,8
2	АСК	120,0	28,5
3	Клопидогрел	—*	13,8

Примечания:

* – в виду того, что клопидогрел является пролекарством, он не может использоваться в *in vitro* тестах.

В группе животных, получавших клопидогрел, время окклюзии было на 57,6% выше показателей контрольной группы исследования, но при этом время лизиса было сравнимо со значениями, полученными в группе исследования контрольных животных (табл. 2).

Таким образом, как видно из полученных результатов исследования на данной модели наибольшее антитромботическое действие продемонстрировал препарат сравнения клопидогрел, который в исследуемой дозе увеличивал время окклюзии тест-системы в 1,7 раза, недостоверно превосходя соединение РУ-1144 и достоверно превосходя ацетилсалициловую кислоту в 1,3 раза. Также показано, что исследованные соединения не оказывают влияния на показатель времени лизиса.

При исследовании влияния соединения РУ-1144 и препаратов сравнения на время кровотечения из хвостовой вены мышей было показано, что в контрольной группе животных данный параметр составил 349,3 с, что совпадает с данными полученными другими исследователями [26]. В таблице 3 отображены результаты изучения влияния тестируемого образца РУ-1144, АСК и клопидогрела на время кровотечения из хвостовой вены мышей.

Так, соединение РУ-1144 приводило к достоверному относительно группы контрольных мышей увеличению времени кровотечения на 27,5%, в то время как АСК и клопидогрел пролонгировали время кровотечения в два раза активнее – на 67,2 и 62,0%, соответственно (табл. 3.). Таким образом, соединение РУ-1144 в меньшей степени оказывало влияние на данный показатель, чем референсные препараты.

ОБСУЖДЕНИЕ

В инициации процессов развития артериального тромбоза значительную роль играют сложные медиаторные взаимодействия между тромбоцитами с вовлечением различных факторов агрегации. Предварительные исследования антиагрегантной активности соединения РУ-1144 в сопоставлении с клопидогрелом и ацетилсалициловой кислотой, как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, позволили определить ингибирующие концентрации (IC_{50}) и эффективные дозы (ED_{50}) данных соединений (табл. 4).

Как показано в табл. 4, при исследовании *in vitro*, соединение РУ-1144 в 21,8 раза превосходит по активности АСК, а в условиях *in vivo* – в 1,5 раза, при этом уступая в 1,3 раза клопидогрелу. По литературным данным, при тромботическом поражении сосудистой стенки аппликацией 50%-м хлоридом железа (III) происходит непосредственное взаимодействие железа с перекисью водорода, образование гидроксил-анионов и изменение фосфолипидного состава мембран тромбоцитов. Вышеуказанные процессы повышают функциональную активность тромбоцитов [21–23, 29]. Кроме того, в крови накапливается

окисленный фибриноген, который активизирует процесс тромбообразования. Пероксидация липидов в мембранах эндотелиоцитов приводит к системным нарушениям функций эндотелия и повышает его проницаемость. Данная модель тромбоза позволяет изучать влияние соединений на скорость формирования артериального (белого) тромба, состоящего в основном из тромбоцитов. Именно, поэтому данная модель была выбрана для изучения соединения РУ-1144, сочетающего два вида активности: антиагрегантную и антиоксидантную.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что соединение РУ-1144 проявляет выраженную антитромботическую активность, превышающую таковую у препаратов сравнения что обусловлено его способностью ингибировать процессы агрегации тромбоцитов и перекисного окисления липидов и тем самым препятствовать возникновению артериального тромбоза в сонной артерии крыс.

Метод «Global Thrombosis Test», позволяет проводить исследования не только антитромботической, но и тромболитической активности соединений. В условиях повышенной турбулентности тока крови в тест-системе Горога соединение РУ-1144 показало способность увеличивать время образования тромба по сравнению со значениями в группе контрольных животных и недостоверное превосходство активности по сравнению с ацетилсалициловой кислотой, однако при этом недостоверно уступая клопидогрелу. Время лизиса под действием тестируемого образца не изменялось, что позволяет сделать вывод об отсутствии у соединения РУ-1144 фибринолитической активности.

Известно, что при проведении длительной терапии антиагрегантными препаратами наблюдается развитие такого побочного эффекта, как кровотечения. Наиболее часто развиваются кровотечения, которые наблюдаются в системе желудочно-кишечного тракта, а также не редки проявления внутричерепных кровоизлияний, вследствие чего происходит увеличение риска ишемических событий [25–28].

Исследование показало, что соединение РУ-1144 увеличивает время кровотечения из хвостовой вены мышей, однако в отличие от АСК и клопидогрела данный эффект выражен в меньшей степени, что позволяет сделать предположение о низкой вероятности возникновения побочного эффекта в виде кровотечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели артериального тромбоза сонной артерии крыс, индуцированного 50%-ным раствором хлоридом железа (III) соединение под лабораторным шифром РУ-1144 оказывает выраженное антитромботическое действие, превосходя антиагрегантные препараты – ацетилсалициловую кислоту и клопи-

догрел в 3,52 и 3,49 раза соответственно, а антиоксидантное средство ЭМГПС в 2,87 раза. В условиях повышенной турбулентности тока крови в тест-системе Горога тестируемый образец РУ-1144 показал способность увеличивать время образования тромба, сравнимое с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом, при этом не оказывая влияние на время

его лизиса. При исследовании соединения РУ-1144 в тесте «время кровотечения» была показана способность тестируемого образца пролонгировать данный показатель, что характерно для группы антиагрегантов, но при этом, в сравнении с ацетилсалициловой кислотой и клопидогрелом, в меньшей степени удлинять данное время.

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. Papapanagiotou A., Siasos G., Gargalionis A., Papavassiliou A.G. et al. The Role of Platelets in Cardiovascular Disease: Molecular Mechanisms // *Curr Pharm Des.* – 2016. – V. 22, N 29. – P. 4493–4505. DOI: 10.2174/1381612822666160607064118
2. Mozaffarian D., Benjamin E.J., Go A.S., Arnett D.K., Blaha M.J., et al. Heart disease and stroke statistics (a report from the American Heart Association) // *Circulation.* – 2016. – N 133. – P. 38–60. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000485
3. Reed G.W., Rossi J.E., Cannon C.P. Acute myocardial infarction in women // *Lancet.* – 2017. – V. 14, N 389. – P. 197–210. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00267-1
4. Grove E.L., Würtz M., Thomas M.R., Kristensen S.D. Antiplatelet therapy in acute coronary syndromes // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2015. – V. 16, N 14. – P. 2133–2147. DOI: 10.1517/14656566.2015.1079619
5. Shaturniy V.I., Shakhidzhanov S.S., Sveshnikova A.N., Pantelev M.A. Activators, receptors and signal transduction pathways of blood platelets. *Biomed Khim.* – 2014. – V. 60, N 2. – P. 182–200. DOI: 10.18097/pbmc20146002182
6. Ambrosio D., Tritto I., Golino P. Reactive oxygen metabolites and arterial thrombosis. *Cardiovascular Research.* – 1998. – V. 34. – P. 4445–4524. DOI: 10.1016/S0008-6363(97)00101-6
7. Aboonabia A., Singh I. The effectiveness of antioxidant therapy in aspirin resistance, diabetes population for prevention of thrombosis // *Biomedicine & Pharmacotherapy.* – 2016. V. 83. – P. 277–282. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.06.044
8. Чещевик В.Т., Жерносеков Д.Д. Тромбоцитарная агрегация. Механизм участия адгезивных молекул и митохондрий // *Вестник Полесского государственного университета.* – 2017. – № 2. – С. 51–61
9. Roka-Moya Y.M. et al. Novel aspects of platelet aggregation // *Biopolym. cell.* – 2014. – Vol. 30, N 1. – P. 10–15. DOI: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000874>
10. Гордеев И.Г., Бекчиу Е.А., Люсов В.А., Волов Н.А., Ильина Е.Е., и др. Оценка влияния миокардиальных цитопротекторов на процессы перекисного окисления липидов у больных стабильной стенокардией до и после хирургической реваскуляризации миокарда // *Российский кардиологический журнал.* – 2005. – №3 (53). – С. 41–46.
11. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Сиротенко В.С., Гайдуркова К.А., Морковник А.С., Анисимова В.А., Диваева Л.Н., Кузьменко Т.А. Антитромботическая активность нового производного диазепинобензимидазола соединения ДАБ-15 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2016. – Т. 162, № 11. – С. 585–588.
12. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Косолапов В.А., Анисимова В.А. Антитромбогенная активность антиоксидантных соединений // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2013. – Т. 155, № 6. – С. 740–742.
13. Kosolapov V.A., Spasov A.A., Anisimova V.A., Zhukovskaya O.N. Condensed Benzimidazoles Are a Novel Scaffold for Antioxidant Agents' Search and Development // *Antioxidants.* – 2019. – P. 245–253. DOI: 10.5772/intechopen.82817
14. Spasov A.A., Nedogoda V.V., Konan K., Kucheryavenko A.F. Mechanism of reduction of platelet sensitivity to medicines in response to low-energy laser radiation of blood // *Hematology and transfusiology.* – 2001. – Т. 46, N 2. С. 36–39.
15. Макаров В.А., Спасов А.А., Плотноков М.Б., Белозерская Г.Г., Васильева Т.М. и др. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на гемостаз. В кн: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России.* – Москва, 2012. – С. 453–479.
16. Житникова Л.М. АСК в профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний: клинические рекомендации для практикующих врачей // *РМЖ. Кардиология.* – 2012. – №14. – С. 708–713.
17. Kurz K.D., Main B.W., Sandusky G.E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride // *Thromb. Res.* – 1990. – N 15. – P. 269–280. DOI: 10.1016/0049-3848(90)90106-m
18. Yamamoto J., Inoue N. et al. Global Thrombosis Test (GTT) can detect major determinants of haemostasis including platelet reactivity, endogenous fibrinolytic and thrombin generating potential // *Thrombosis Research.* – 2014. – V. 133. – P. 919–926. DOI: 10.1016/j.thromres.2014.02.018
19. Greene T.K., Schiviz A. et al. Towards a standardization of the murine tail bleeding model // *J. Thromb. Haemost.* – 2010. – V. 8, N 12. – P. 2820–2822. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2010.04084.x

20. Haber F., Weiss J. On the catalysis of hydroperoxide // *Naturwissenschaften*. – 1932. – V. 20. – P. 948–950.
21. Freedman J. E. Oxidative Stress and Platelets // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. – 2008. – N 28. – P. 11–16. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.159178. Epub 2008 Jan 3.
22. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine // *Redox Biol*. – 2015. – N 4. – P. 180–183. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.002
23. Dogne J.M., Hanson J., Leval X. et al. Pharmacological characterization of N-tert-Butyl-N-[2-(4-methylphenylamino)-5-nitrobenzenesulfonyl]urea (BM-5730, a novel Thromboxane A2 receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor in a rat model of arterial thrombosis and its effects on bleeding time // *J. of Pharmacol. And Exp. Therap.* – 2004. – N 309. – P. 498–505. DOI: 10.1124/jpet.103.063610
24. Bucciheri S., Capodanno D., James S., Angiolillo D.J. Bleeding after antiplatelet therapy for the treatment of acute coronary syndromes: a review of the evidence and evolving paradigms // *Expert Opin Drug Saf.* – 2019. – N 25. – P. 1–19. DOI: 10.1080/14740338.2019.1680637
25. Qiu L., Han J.X., See A.A.Q., King N.K.K. Effects of anticoagulant and antiplatelet agents in severe traumatic brain injury in an asian population – A matched case-control study // *J Clin Neurosci.* – 2019. – P. 61–66. DOI: 10.1016/j.jocn.2019.08.087.
26. Спасов А.А., Кучерявенко А.Ф., Тянь М., Анисимова В.А. Антитромботическая активность соединения РУ-891 // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2013. – Т. 76. – № 6. – С. 25–26. DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2013-76-6-25-26>
27. Spronk H. M. H., Padro T., Siland J. E. Atherothrombosis and Thromboembolism: Position Paper from the Second Maastricht Consensus Conference on Thrombosis // *Thromb Haemost.* – 2018. – V. 118, N 2. – P. 229–250. DOI: 10.1160/TH17-07-0492
28. Dadjou Y., Safavi S., Javad K. Risks and Benefits of Dual Antiplatelet Therapy Beyond 12 Months After Coronary Stenting // *Medicine (Baltimore)*. – 2016. – V. 95, N 22. – P. 1–7. DOI: 10.1097/MD.0000000000003663
29. Шахмарданова С.А., Гулевская О.Н., Селецкая В.В., Зеленская А.В. и др. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине // *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. – 2016. – N 3. – С. 4–12.
30. Bath P.M., May J., Heptinstall S. Clinical utility of remote platelet function measurement using P-selectin: assessment of aspirin, clopidogrel, and prasugrel and bleeding disorders // *Platelets*. – 2018. – N 29(5). – P. 425–430. DOI: 10.1080/09537104.2018.1445839
31. Spasov A.A., Kucheryavenko A.F., Gaidukova K.A., Kosolapov V.A., Zhukovskaya O.N. Antiplatelet activity of new derivatives of benzimidazole containing sterically hindered phenolic group in their structure // *Research Results in Pharmacology*. – V. 6, N 1. – P. 1–9. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.50373

АВТОРЫ

Спасов Александр Алексеевич – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0002-7185-4826. E-mail: aspasov@mail.ru

Кучерявенко Аида Фатиховна – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0003-1406-6919. E-mail: aidakuchryavenko@yandex.ru

Гайдукова Ксения Андреевна – ассистент кафедры фармакологии и биоинформатики

ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0003-4376-6332. E-mail: ksenijagajjukva@rambler.ru

Черников Максим Валентинович – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой биологии и физиологии ПМФИ. ORCID ID: 0000-0001-8340-1296. E-mail: pharmax@list.ru

Жуковская Ольга Николаевна – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории органического синтеза НИИ физической и органической химии Южного федерального университета. ORCID ID: 0000-0003-0865-6656. E-mail: zhukowskaia.ol@yandex.ru

УДК 616.25-002.28:615.472



КОМПЛЕКСНАЯ БИОСТИМУЛЯЦИЯ ВНУТРИПЛЕВРАЛЬНОГО АДГЕЗИОГЕНЕЗА В ТОРАКАЛЬНОЙ ХИРУРГИИ

Калашников А.В.¹, Воробьев А.А.², Калашникова С.А.¹, Салимов Д.Ш.³

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

²Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

³Федеральное казенное учреждение «Центральный военный клинический госпиталь имени П.В. Мандрыка» Министерства обороны Российской Федерации 107076, Россия, г. Москва, Большая Оленья улица, владение 8А

E-mail: kalashnikova-sa@yandex.ru

Получено 15.01.2020

Рецензия (1) 30.03.2020

Рецензия (2) 15.04.2020

Принята к печати 15.05.2020

Цель. Определить эффективность применения плазмы, обогащенной тромбоцитами в комплексном лечении травмы грудной клетки и хронической эмпиемы плевры.

Материалы и методы. Работа выполнена на 450 крысах-самцах, которым моделировали травму грудной клетки (n=180) и хроническую эмпиему плевры (n=270). В опытных группах осуществлялась биостимуляция адгезиогенеза: внутривнеплевральное введение 1 мл плазмы, обогащенной тромбоцитами, в группе сравнения при эмпиеме плевры вводили 1 мл раствора доксициклина, в группах негативного контроля лечения не проводилось. Выведение из эксперимента на 10-е, 20-е, 30-е сутки. Образцы внутривнеплевральных сращений фиксировали в 10%-ом формалине с последующей гистологической проводкой и изготовлением микропрепаратов, окраской гематоксилином и эозином. Морфометрическое исследование включало определение объемной доли (ОД) коллагеновых и ретикулярных волокон; фибрина; клеток воспалительного ряда; сосудистого русла (%).

Результаты. Внутривнеплевральное введение плазмы, обогащенной тромбоцитами, является эффективным способом стабилизации реберного каркаса – при травмах грудной клетки, и ликвидации остаточных полостей – при хронической эмпиеме плевры. При оценке выраженности спаечного процесса при травме грудной клетки установлено, что наиболее часто спайки визуализируются в местах перелома ребер (от 13,3 до 40%). При эмпиеме плевры на протяжении всего наблюдения ОД коллагеновых волокон, формирующих спайки, была выше в группе с биологической стимуляцией адгезиогенеза, чем в группе НКэп и в ГСэп. В PRP-группе данный показатель уже на начальных сроках эксперимента был достоверно ниже, чем в группе НК и ГС (p<0,05).

Заключение. На основании полученных данных доказана эффективность применения плазмы, обогащенной тромбоцитами в торакальной хирургии для биологического потенцирования адгезиогенеза: при экспериментальных травмах грудной клетки и хронической эмпиеме плевры.

Ключевые слова: торакальная хирургия; биостимуляция адгезиогенеза; плазма, обогащенная тромбоцитами; травма грудной клетки; эмпиема плевры

Сокращения: ТГК – травма грудной клетки; НКт – группа негативного контроля с травмой грудной клетки (без фармакологической коррекции); PRPt – введение плазмы, обогащенной тромбоцитами для лечения травмы грудной клетки; ЭП – эмпиема плевры; НКэп – группа негативного контроля с эмпиемой плевры (без фармакологической коррекции); PRPэп – введение плазмы, обогащенной тромбоцитами для лечения эмпиемы плевры; ГС – группа сравнения; ГСэп – группа сравнения без фармакологической поддержки.

Для цитирования: Калашников А.В., Воробьев А.А., Калашникова С.А., Салимов Д.Ш. Комплексная биостимуляция внутривнеплеврального адгезиогенеза в торакальной хирургии. *Фармация и фармакология*. 2020;8(2): 86-99. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-86-99

© Калашников А.В., Воробьев А.А., Калашникова С.А., Салимов Д.Ш., 2020

For citation: Kalashnikov A.V., Vorobiev A.A., Kalashnikova S.A., Salimov D.Sh. Complex biostimulation of intrapleural adhesiogenesis in thoracic surgery. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(2):86-99. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-86-99

COMPLEX BIOSTIMULATION OF INTRAPLEURAL ADHESIOGENESIS IN THORACAL SURGERY

Kalashnikov A.V.¹, Vorobiev A.A.², Kalashnikova S.A.¹, Salimov D.Sh.³

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

² Federal State Budgetary Institution of Higher Education "Volgograd State Medical University"
1, pl. Fallen Fighters, Volgograd, Russia, 400131

³ Federal State Institution "Central Military Clinical Hospital named after P.V. Mandryka"
8A, Bolshaya Olenya street, Moscow, Russia, 107076

E-mail: kalashnikova-sa@yandex.ru

Received 15 January 2020

Review (1) 30 March 2020

Review (2) 15 April 2020

Accepted 15 May 2020

The aim of the study is to determine the effectiveness of the use of platelet enriched plasma in the complex treatment of chest trauma and chronic pleural empyema.

Materials and methods. The work was performed on 450 male rats, simulated with chest trauma (n=180) and chronic pleural empyema (n=270). In the experimental groups, biostimulation of adhesiogenesis as an intrapleural injection of 1 ml of platelet-enriched plasma was carried out; in the comparison group; the animals with pleural empyema were injected with 1 ml of doxycycline solution; in the negative control groups, the treatment was not carried out at all. Withdrawal from the experiment took place on the 10th, 20th, 30th days. The samples of intrapleural adhesions were fixed in 10% formalin, followed by histological tracing and preparation of micropreparations, staining with hematoxylin and eosin. The morphometric study included determination of the volume fraction (VF) of collagen and reticular fibers; fibrin; inflammatory cells; blood-stream (%).

Results. An intrapleural administration of platelet-rich plasma is an effective way to stabilize the rib cage in chest injuries, and to eliminate residual cavities in chronic pleural empyema. When assessing the severity of the adhesions in chest trauma, it was found out that adhesions are most often visualized at the sites of rib fractures (from 13.3 to 40%). In pleural empyema, during the entire process of observation, the VF of collagen fibers forming adhesions was higher in the group with biological stimulation of adhesiogenesis than in the NCpe group and in the CG. In the PRP group, already at the initial stages of the experiment, this indicator was significantly lower than in the NC and CG (p<0.05).

Conclusion. Based on the data obtained, the effectiveness of the use of platelet-enriched plasma in thoracic surgery for the biological potentiation of adhesiogenesis has been proved in experimental chest injuries and chronic pleural empyema.

Keywords: thoracic surgery; biostimulation of adhesiogenesis; platelet-enriched plasma; chest trauma; pleural empyema

Abbreviations: Ch.Inj.T – chest injury trauma; NCT – negative control group with chest trauma (without pharmacological correction); PRPt – administration of platelet-rich plasma for the treatment of chest trauma; PE – pleural empyema; NCpe – negative control group with pleural empyema (without pharmacological correction); PRPpe – administration of platelet-rich plasma for the treatment of pleural empyema; CG – comparison group, CGpe – comparison group without pharmacological correction.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время одним из перспективных направлений регенераторной медицины является биологическая стимуляция процессов репарации с использованием плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP – platelet rich plasma), содержащей многочисленные факторы роста и цитокины [1–3].

Препараты, разработанные на основе аутологических компонентов, все шире внедряются в косметологию и травматологию, однако в торакальной хирургии биотехнологии на основе PRP-технологий до настоящего времени не нашли применения, что и обуславливает актуальность данной работы. По-прежнему нерешенными проблемами остается стабилизация реберного каркаса при тяжелых сочетанных травмах и ликвидация остаточных полостей при хронических эмпиемах плевры, что требует поиска новых решений с применением биологической стимуляции адгезиогенеза в комплексном лечении данных нозологий [4–7].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ – определение эффективности применения плазмы, обогащенной тромбоцитами, в комплексном лечении травмы грудной клетки и эмпиемы плевры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

Эксперимент выполнен на 450 нелинейных половозрелых крысах-самцах (сток), массой 280-300 г, которые содержались в стандартных условиях вивария, с естественной сменой суточного цикла, свободным доступом к экструдированному корму и воде. Содержание и манипуляции проводились в соответствии с приказом Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. и Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемой для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.) [8, 9]. Положительное заключение на экспериментальные исследования Локального независимого этического

комитета Волгоградского государственного медицинского университета получено 29.09.2016 года, протокол №12-2016.

Дизайн исследования

Дизайн эксперимента представлен на рис. 1.

Животным моделировали травму грудной клетки ($n=180$) и хроническую эмпиему плевры ($n=270$) с использованием авторских методик после наркотизации (хлоралгидрат 350 мг/кг интраперитонеально). При моделировании ТГК выделяли группу негативного контроля (НКт) и экспериментальную группу (PRPt), которым осуществлялось биологическое потенцирование адгезиогенеза введением в плевральную полость плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP): набор для забора крови Plasmolifting™, ООО «Плазмолифтинг», г. Казань, Россия. ТУ 9437-002-27837594-2015, регистрационное удостоверение № РЗН 2016/3980 от 19.04.2016. Протокол проведения процедуры:

I этап. Забор крови в объеме 5 мл из хвостовой вены с помощью шприца в специализированную пробирку Plasmolifting™.

II этап. Центрифугирование 1000 G (3200 оборотов) 5 мин., разделение на фракции, получение тромбоцитарной аутоплазмы.

III этап. Забор супернатанта (тромботической аутологичной плазмы), которая располагается в верхней части пробирки над разграничительным гелем (рис. 2.6).

IV этап. Введение 1 мл препарата при переломах ребер: точно в зону перелома, субплеврально и в плевральную полость; при хронической эмпиеме плевры – непосредственно в остаточную плевральную полость.

При моделировании хронической ЭП кроме вышеописанных групп была добавлена группа сравнения (ГСэп), животным которой вводили 1 мл раствора доксицилина внутривнутриплеврально. Доксицилин (Doxycyclinum) является полусинтетическим бактериостатическим антибиотиком из группы тетрациклинов широкого спектра действия. Химическое название (4S,4aR,5S,5aR,6R,12aS)-4-диметиламин-3,5,10,12,12a-пентагидрокси-6-метил-1,11-диокси-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-октагидронафтацен-2-карбоксиамида моногидрохлорид, в смеси с этанолом (2:1), полугидрат $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl \cdot \frac{1}{2}C_2H_5OH \cdot \frac{1}{2}H_2O$. Торговое название Doxycycline, БИНЕРГИЯ ЗАО (Россия), лиофилизат для приготовления раствора для инфузий 100 мг флаконы (5) контурные пластиковые (1), пачки картонные. Код АТХ J01AA02. Состав: доксицилин (в форме гидрохлорида) 100 мг, вспомогательные вещества: натрия дисульфит – 6 мг, динатрия эдетат – 0,02 мг. Кроме антибактериального действия, оказываемого Доксициклином, данное вещество, согласно Национальным клиническим рекомендациям по торакальной хирургии, является препаратом выбора

для химического плевродеза [10–12]. Выведение из эксперимента проводили на 10-е, 20-е и 30-е сутки эксперимента. Описание макроскопической картины плевральной полости и забор внутривнутриплевральных спаек осуществляли с максимальным сохранением точек прикрепления [13].

Гистологическое исследование

Осуществлен забор 1350 образцов внутривнутриплевральных сращений с максимальным сохранением точек прикрепления спаек между париетальной и висцеральной плеврой и фиксацией материала в 10% растворе нейтральном формалине (экспозиция 24 ч), осуществляли стандартную гистологическую проводку, проводя фиксированный материал по этиловому спирту в восходящей концентрации (от 70° до 100°) и хлороформу. Комплексное морфологическое исследование включало изготовление серийных срезов внутривнутриплевральных сращений на разных сроках эксперимента с окраской гематоксилином и эозином. Микрофотографии сделаны с использованием микроскопа «Leica DM 100» с цифровой фотокамерой, увеличение $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$.

Морфометрическое исследование

Морфометрическое исследование проводилось в соответствии со сложившимися принципами количественных морфологических исследований, согласно которым проводят измерение на микрофотограммах, полученных при фотодокументировании серийных срезов (и определением количества объектов не менее чем на 10 стеклах в 10 полях зрения) [автандилов]. С помощью программы «Видеотест Морфо» определяли объемные доли (ОД) коллагеновых и эластических волокон, фибрина, клеточный состав спаек (лимфоциты, лейкоциты, фибробласты) и ОД сосудистого русла [14].

Статистическая обработка результатов

Полученные результаты были обработаны с использованием прикладного программного пакета STATISTICA 7.0 (StatSoft, США) и определяли $M \pm SEM$, непараметрического критерия Вилкоксона, критерия Стьюдента (t) и показателя достоверности (p). Результаты считались достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективность плазмы, обогащенной тромбоцитами при внутривнутриплевральном введении для потенцирования адгезиогенеза при травме грудной клетки по результатам макроскопического исследования

В результате сравнительного анализа опытной группы и группы негативного контроля установлено, что на 10-е сутки эксперимента при ТГК не было отмечено случаев консолидации переломов ребер. В группе НКт спаечный процесс отсутствовал в 16,7%

случаев, в 36,7% спайки образовывались локально, исключительно в зоне операционной травмы и были представлены белесоватыми полупрозрачными тяжами (паутинные спайки), рис. 2А.

При внутривидеальном введении PRP спайки не формировались лишь в 6,7%, что достоверно меньше, чем в группе НКт ($p < 0,05$). Обращает на себя внимание тот факт, что внутривидеальные сращения были представлены более плотными (плечатыми) спайками, локализованными преимущественно между торакотомным рубцом и париетальной и висцеральной плеврой (рис. 2Б).

Консолидация реберных отломков на 20-е сутки эксперимента зафиксирована у 66,7% животных группы НКт и у 77,8% – опытной группы. Спайки в группе НКт, как и на предыдущем сроке эксперимента, преимущественно образовывались в зоне операционной травмы – в 43,3% и были представлены паутинными и плечатыми сращениями (рис. 3А).

При введении плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRPt) на 20 сутки в плевроальную полость лишь в 1 случае (3,3%) спайки отсутствовали, в остальных случаях было зафиксировано спайкообразование с тотальным заращением плевроальной полости в 13,3% (4 случая). Наиболее часто определялись спайки в зоне перелома – 40,0%, а также единичные локальные спайки (20,0%) и единичные спайки вне зоны перелома (23,3%). Спаечные сращения были представлены плотными, плоскостными спайками (рис. 3Б).

На 30-е сутки эксперимента в группе НКт отмечалась консолидация мест перелома с образованием выраженной костной мозоли. Отмечено сужение и деформация межреберных промежутков, сформировавшихся за счет спаечного процесса. Тотального заращения плевроальной полости не выявлено (рис. 4А).

К окончанию эксперимента (30-е сут.) в группе PRPt тотальное заращение плевроальной полости наблюдалось в 13,3% (4 случая). На рис. 4Б представлена наиболее типичная ситуация, характеризующаяся формированием плоскостной интимной спайки в месте перелома при биостимуляции адгезиогенеза плазмой, обогащенной тромбоцитами. Протяженность спайки – 10 мм, ширина 4 мм, толщина до 1 мм, общая площадь органной спайки составила 40 мм², отмечалось оскудение васкуляризации по сравнению с предыдущим сроком.

Таким образом, при сравнительном анализе спаечного процесса в плевроальной полости при травме грудной клетки установлены достоверные различия у крыс НКт и опытной группой PRPt. В группе НКт преобладали паутинные и плечатые сращения, в то время как при биостимуляции адгезиогенеза плазмой, обогащенной тромбоцитами обнаруживались лентовидные и плоскостные спайки, плотность которых увеличивалась в динамике эксперимента.

Эффективность плазмы, обогащенной тромбоцитами при внутривидеальном введении для потенцирования адгезиогенеза при травме грудной клетки по результатам гистологического исследования

При гистологическом исследовании плевроальных спаек на 10-е сутки экспериментальной травмы грудной клетки как в группе НКт, так и в группе PRPt характеризовались преобладанием хаотично расположенных волокон соединительной ткани с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. При этом в группе НКт в исследуемых образцах обнаруживался диффузно расположенный серозно-геморрагический экссудат с отложениями фибрина (рис. 5А).

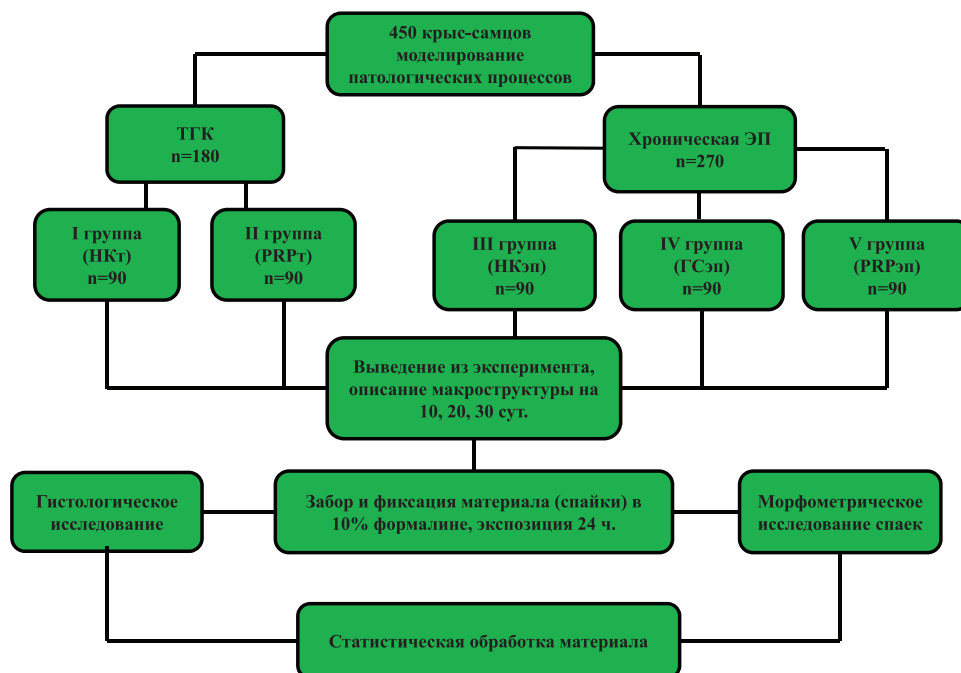
В опытной группе на 10-е сутки эксперимента определялись тонкие волокна соединительной ткани, расположенные неравномерно, преимущественно в зоне перелома и введения препарата. Количество экссудата было незначительным, отмечалась его организация на фоне сохраняющейся воспалительной реакции (рис. 5Б).

Объем серозно-геморрагического экссудата на 20-е сутки эксперимента в группе НКт был незначителен, выявлен отек соединительной ткани, представленной хаотично локализованными волокнами, по типу миксоматозной трансформации. Определялись единичные сосуды и диффузная преимущественно нейтрофильная воспалительная инфильтрация. Отмечалось несоответствие незрелых плевроальных сращений сроку эксперимента (рис. 6А).

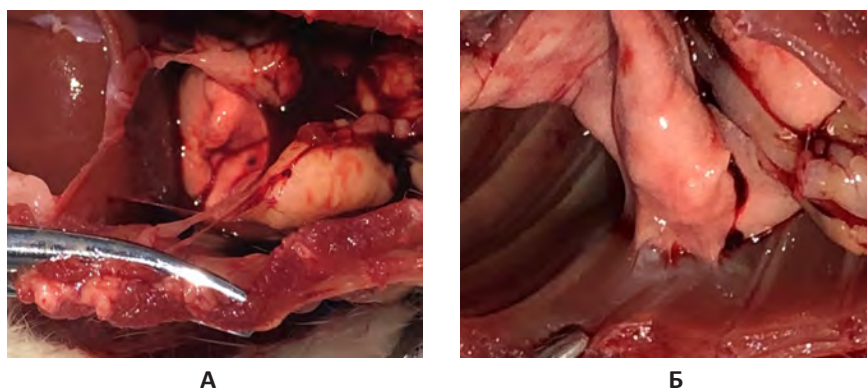
При введении PRP на 20-е сутки определялись молодые плевроальные сращения, содержащие в своем составе волокна, ориентированные параллельно поверхности стенок плевроальной полости. В рыхло расположенных волокнах соединительной ткани визуализировались единичные гранулы гемосидерина, что связано с изменением проницаемости эндотелия и базальной мембраны и свидетельствовало о продолжающемся адгезиогенезе (рис. 6Б).

В группе НКт на 30-е сутки эксперимента спайки по-прежнему были незрелыми. Кровенаполнение сосудов и присутствие гранул гемосидерина с сидерофагами свидетельствовало о продолжающемся ангиогенезе и формировании плевроальных сращений. Сосуды были тонкостенными, полнокровными и располагались неравномерно среди волокон соединительной ткани. Отмечалось наличие единичных лимфоцитов, плазматических и нейтрофилов, а также обилие макрофагов (сидерофагов) (рис. 7А).

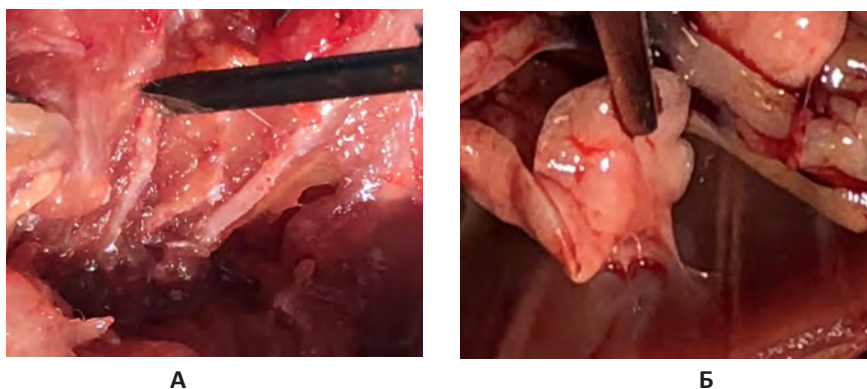
При гистологическом исследовании морфологических изменений в плевроальной полости при биостимуляции адгезиогенеза введением плазмы, обогащенной тромбоцитами к окончанию эксперимента определялись зрелые сращения в области перелома ребер. Спайки сформированы строго ориентированными коллагеновыми волокнами и включали в свой состав фибробласты, фиброциты, с единичными в поле зрения сосудами (рис. 7Б).

**Рисунок 1 – Дизайн эксперимента**

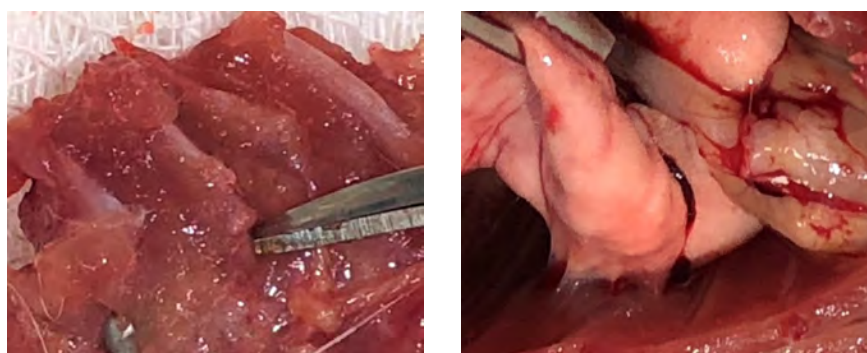
Примечание: ТГК – травма грудной клетки; НКт – группа негативного контроля с травмой грудной клетки (без фармакологической коррекции); PRPt – введение плазмы, обогащенной тромбоцитами для лечения травмы грудной клетки; ЭП – эмпиема плевры; НКЭп – группа негативного контроля с эмпиемой плевры (без фармакологической коррекции); PRPЭп лечения эмпиемы плевры.

**Рисунок 2 – Плевральная полость на 10-е сутки экспериментальной травмы грудной клетки**

Примечание: А. Группа негативного контроля. Б. Опытная группа. Введение плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRPt). Отсутствие консолидации реберных отломков.

**Рисунок 3 – Плевральная полость на 20-е сутки экспериментальной травмы грудной клетки**

Примечание: А. Группа негативного контроля. Наличие консолидации переломов ребер, отсутствие внутриплевральных спаек. Б. Опытная группа. Введение плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRPt), образование плевральных сращений.

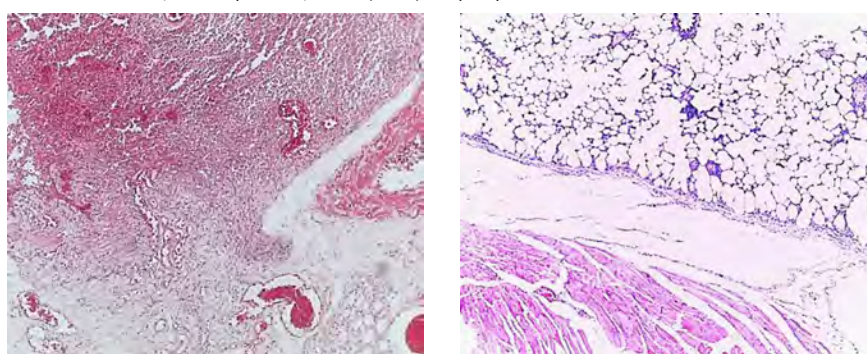


А

Б

Рисунок 4 – Плевральная полость на 30-е сутки экспериментальной травмы грудной клетки

Примечание: А. Группа негативного контроля. Наличие консолидации переломов ребер, отсутствие внутривисцеральных спаек. Б. Опытная группа. Введение плазмы, обогащенной тромбоцитами (PRP). Формирование плоскостных спаек.

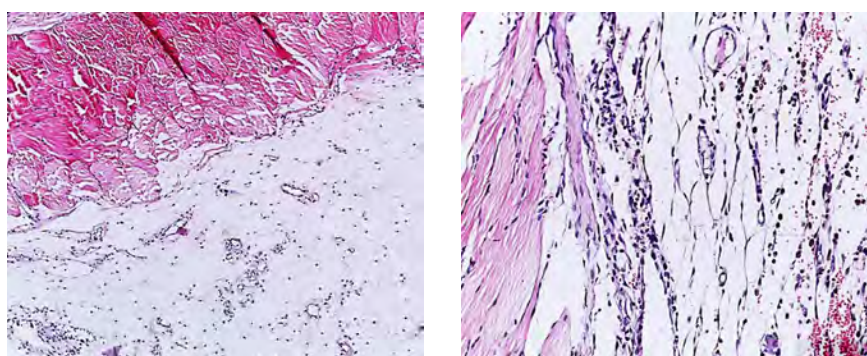


А

Б

Рисунок 5 – Экспериментальная травма грудной клетки 10-е сутки

Примечание: А. Группа НКт. Б. Группа PRPт. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×400.

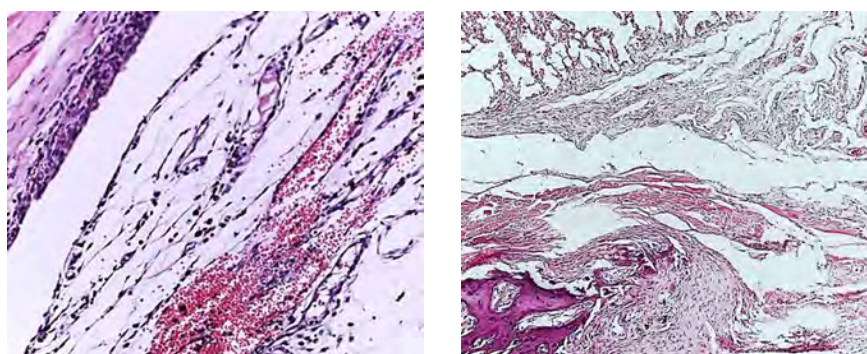


А

Б

Рисунок 6 – Экспериментальная травма грудной клетки 20-е сутки

Примечание: А. Группа НКт. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×100. Б. Опытная группа PRPт. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×200.



А

Б

Рисунок 7 – Экспериментальная травма грудной клетки 30-е сутки

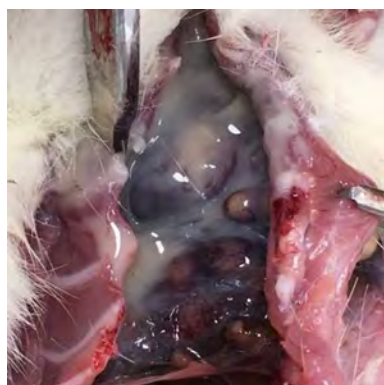
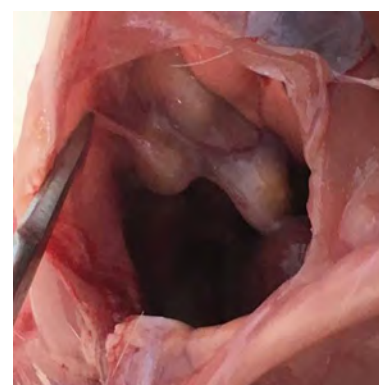
Примечание: А. Группа НКт. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×200. Б. Опытная группа PRPт. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×400.

Таблица 1 – Морфометрические показатели состава спаек у крыс с травмой грудной клетки на фоне плазмы, обогащенной тромбоцитами для потенцирования адгезиогенеза ($M \pm m$, %)

Показатели, ОД (%)	Экспериментальные группы					
	НКт			PRPt		
	10-е сут	20-е сут	30-е сут	10-е сут	20-е сут	30-е сут
Коллагеновые волокна	3,04±0,8	15,11±2,3#	33,72±9,7#	8,23±0,9*	29,15±3,1*#	37,23±8,3*#
Ретикулярные волокна	31,56±3,5	25,05±0,9#	2,95±0,7#	30,19±3,7	15,03±1,1*#	4,15±0,3#
Фибрин	8,11±0,9	6,09±0,3	5,21±0,3#	9,15±0,9	4,25±0,8*#	4,08±0,5
Лейкоциты	22,17±1,7	18,75±3,5	9,73±0,5#	21,95±3,9	17,21±2,5	8,92±0,8#
Лимфоциты	11,01±0,9	14,15±0,8	20,12±7,3#	10,27±0,9	15,95±1,9	19,75±1,3
Фибробласты	6,88±0,5	10,05±1,3	18,36±3,5#	7,07±0,8	10,21±0,7	21,03±1,5#
Сосуды	17,23±2,5	10,80±2,5#	9,91±0,8#	13,14±1,5	8,2±0,9*#	4,84±0,3*#

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с группой НКт ($p < 0,05$);# – достоверность различий по сравнению с предыдущим сроком ($p < 0,05$).**Таблица 2 – Морфометрические показатели состава спаек у крыс при хронической эмпиеме плевры на фоне введения плазмы, обогащенной тромбоцитами для потенцирования адгезиогенеза ($M \pm m$, %)**

Показатели, ОД (%)	Экспериментальные группы					
	НКЭп			PRPЭп		
	10 сут	20 сут	30 сут	10 сут	20 сут	30 сут
Коллагеновые волокна	1,09±0,7	11,13±1,7#	30,08±3,1#	8,19±0,8*	23,07±1,5*#	32,64±4,1#
Ретикулярные волокна	33,72±2,3	29,16±3,6#	7,26±0,8#	30,75±2,9	15,28±3,5*#	5,11±0,5*#
Фибрин	9,23±0,8	7,95±0,9	5,83±0,3#	10,67±0,7	8,17±0,9	4,97±0,1#
Лейкоциты	21,16±1,3	19,31±2,1	11,12±1,1#	23,13±4,1	16,81±3,3	8,13±0,9
Лимфоциты	13,11±1,9	14,29±0,7	19,19±5,7	12,87±0,8	16,03±1,1#	21,40±1,1
Фибробласты	8,02±0,3	9,83±1,1	17,23±2,9	6,92±0,8	12,91±0,8	19,73±1,1
Сосуды	13,67±1,9	8,33±0,3	9,29±0,9	7,47±1,1#	7,73±0,9*#	8,02±0,5

Примечание: * – достоверность различий по сравнению с группой НКЭп ($p < 0,05$);# – достоверность различий по сравнению с предыдущим сроком ($p < 0,05$).**А****Б****В****Рисунок 8 – Плевральная полость на 10 сут экспериментальной эмпиемы плевры в группе сравнения**

Примечание: А. Группа негативного контроля (НКЭп). Полость заполнена жидким гноем, множественные абсцессы. Б. Группа сравнения (ГСЭп). В. Опытная группа (PRPЭп).

Морфометрическая оценка эффективности плазмы, обогащенной тромбоцитами, для потенцирования адгезиогенеза при травме грудной клетки в динамике

Морфометрический анализ полностью согласовывался с результатами гистологического исследования (табл. 1).

При определении ОД коллагеновых и ретикулярных волокон, формирующих спайки, установлены достоверные различия в группе НКт и в опытной группе PRPt. Так, ОД коллагеновых волокон на 10-е сутки эксперимента в группе НКт была достоверно меньше, чем в экспериментальной группе со стимуляцией адгезиогенеза плазмой, обогащенной тромбоцитами ($3,04 \pm 0,8\%$ $8,23 \pm 0,9\%$ соответственно) $p < 0,05$. На фоне увеличения доли коллагеновых волокон происходило достоверное снижение ОД ретикулярных волокон, резко уменьшавшихся на 30-е сутки эксперимента ($p < 0,05$).

Кроме этого на всех сроках эксперимента определялись достоверные различия в группе НК и экспериментальных группах при определении ОД клеточного состава спаек: лейкоцитов, лимфоцитов, фибробластов ($p < 0,05$).

Таким образом, в результате комплексного морфологического исследования установлено, что биологическое потенцирование адгезиогенеза плазмой, обогащенной тромбоцитами является эффективной мерой стабилизации реберного каркаса при травмах грудной клетки с множественными переломами ребер.

Эффективность плазмы, обогащенной тромбоцитами при внутриплевральном введении для потенцирования адгезиогенеза при хронической эмпиеме плевры по результатам макроскопического исследования

В результате проведенного исследования установлены достоверные различия в морфогенезе остаточных полостей у животных групп сравнения и опытных групп. При проведении сравнительной характеристики экспериментальной хронической эмпиемы плевры и спаечного процесса в плевральной полости без лечения и при различных способах биологической стимуляции спайкообразования было установлено, что на 10-е сутки эксперимента во всех группах исследования, в том числе в группе негативного контроля, в группе сравнения и в трех экспериментальных группах, макроскопически сохранялась остаточная полость. Выраженность спаечного процесса зависела от тактики ведения остаточной плевральной полости, возникшей при экспериментальном моделировании эмпиемы плевры.

В группе НКэп объем остаточной плевральной полости был максимальным и в среднем составлял $25,1 \pm 3,1$ мм³. В основном у животных данной группы определялись единичные спайки (50,0%), в 36,7% случаев спайки отсутствовали, множественные спай-

ки обнаружены лишь в 13,3%, при этом морфологически определялись преимущественно паутинные спайки. Полость была заполнена жидким гноем без признаков организации. Висцеральная плевро утолщена до 1–1,5 мм, в ее толще определялись абсцессы диаметром от 1 до 3 мм (рис. 8А).

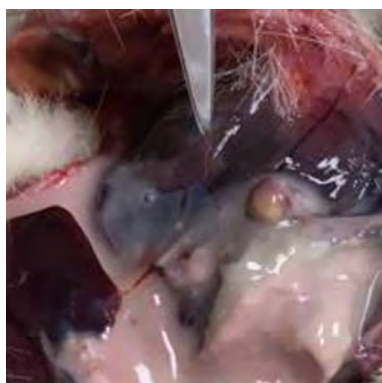
В ГСэп также как и в группе НКэп тотальное заращение остаточной полости не наблюдалось. Однако определялись внутриплевральные спайки, как единичные – в 56,7%, так и множественные – 23,3%. Объем остаточной плевральной полости был меньше, чем в группе НК – $23,2 \pm 2,5$ мм³, ($p > 0,05$). В ГС остаточная полость эмпиемы была сформирована париетальной плеврой, висцеральной плеврой верхней доли, междолевой бороздой, нижней долей и диафрагмой. В толще плеврой определялись множественные инкапсулированные абсцессы до 3 мм в диаметре. На поверхности плеврой имелись очаговые отложения фибрина (рис. 8Б).

В опытной группе на фоне введения плазмы, обогащенной тромбоцитами, на 10-е сутки экспериментальной ЭП определялись остаточные полости небольшого объема, раздробленные единичными органами спайками на сектора. Внутриплевральные сращения чаще всего располагались в области реберно-диафрагмального синуса и были пронизаны вновь образованными сосудами, что свидетельствовало об активном формировании спаек (рис. 8В).

На 20-е сутки экспериментальной ЭП в группе НК определялась остаточная полость, содержащая гнойный экссудат. Пиогенная оболочка была утолщена за счет отложения фибрина до 2 мм, инфильтрирована многочисленными микроабсцессами. Купол диафрагмы сглажен, отмечалась деформация синусов, при этом внутриплевральные сращения отсутствовали (рис. 9А).

В передненижних отделах плевральной полости у крыс ГСэп определялась остаточная полость эмпиемы с утолщенными стенками, содержащая организованный экссудат. Обнаружены многочисленные спайки, преимущественно пленчатые и плоскостные, локализованные в плевро-диафрагмальных синусах и междолевой борозде. Выраженный внутриспайчный воспалительный процесс и богатая неоваскуляризация свидетельствовали об активном формировании спайки (рис. 9Б).

При биологическом потенцировании адгезиогенеза с помощью введения плазмы, обогащенной тромбоцитами, определялись деформированные (за счет спаечного процесса) остаточные полости без гнойного содержимого, с очаговыми отложениями фибрина на стенках, толщиной до 2 мм. Морфологически спайки были представлены широким спектром: единичные органы спайки сочетались с множественными пленчатыми и лентовидными сращениями, которые хаотично располагались внутри остаточной полости значительно сокращая ее объем (рис. 9В).



А



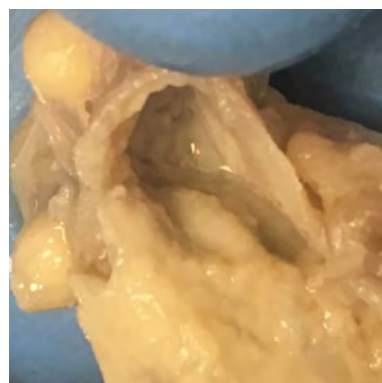
Б



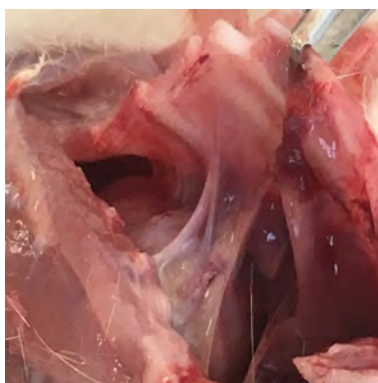
В

Рисунок 9 – Плевральная полость на 20-е сутки экспериментальной эмпиемы плевры

Примечание: А. Группа негативного контроля (НКЭп). Полость заполнена жидким гноем, множественные абсцессы. Б. Группа сравнения (ГСЭп). В. Опытная группа (PRPЭп).



А



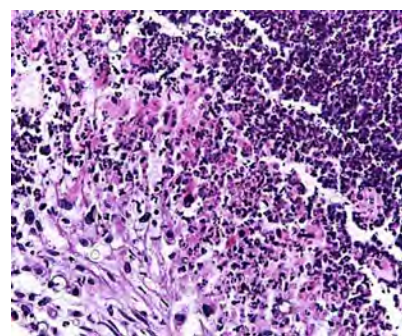
Б



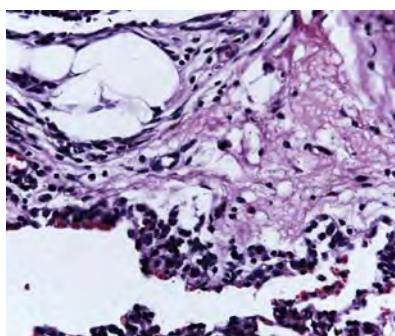
В

Рисунок 10 – Плевральная полость на 30-е сутки экспериментальной эмпиемы плевры

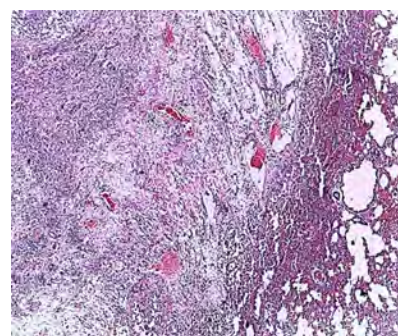
Примечание: А. Группа негативного контроля (НКЭп). Б. Группа сравнения (ГСЭп). В. Опытная группа (PRPЭп).



А



Б



В

Рисунок 11 – Формирование незрелой соединительной ткани при эмпиеме плевры на 10-е сутки эксперимента на фоне хронической эмпиемы плевры крыс

Примечание: А. Группа негативного контроля (НКЭп). Б. Группа сравнения (ГСЭп). В. Опытная группа (PRPЭп) при введении плазмы, обогащенной тромбоцитами. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×400.

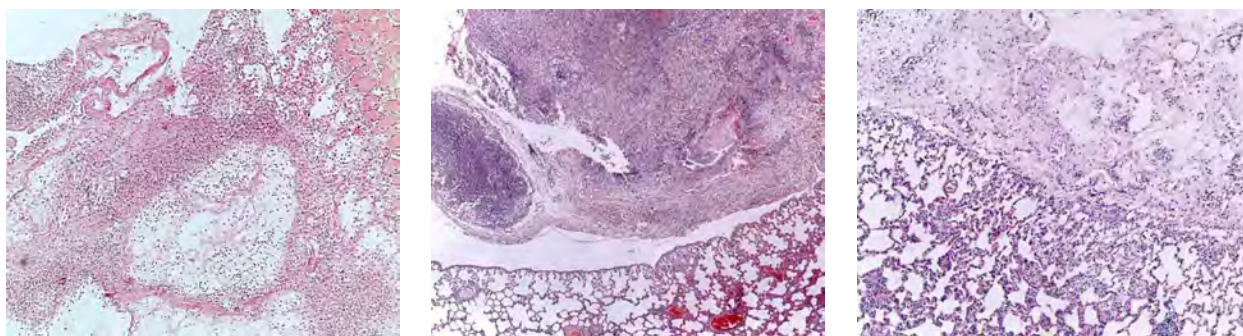


Рисунок 12 – Экспериментальная эмпиема плевры на 20-е сутки эксперимента

Примечание: А. Группа НКЭп. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$. Б. Группа сравнения. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$. В. Опытная группа (PRPЭп) при введении плазмы, обогащенной тромбоцитами. Фаза молодых сращений с наличием незрелой соединительной ткани на фоне хронической эмпиемы плевры крыс на 20 сут при введении плазмы, обогащенной тромбоцитами. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 100$.

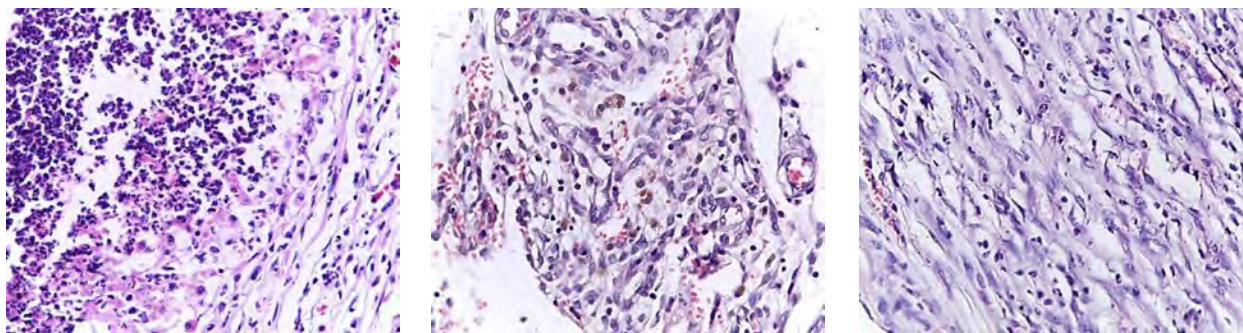


Рисунок 13 – Экспериментальная эмпиема плевры на 30-е сутки эксперимента

Примечание: А. Группа НКЭп. Б. Группа сравнения. В. Опытная группа (PRPЭп) при введении плазмы, обогащенной тромбоцитами. Зрелая спайка в плевральной полости крыс с наличием ориентированных соединительно-тканых волокон, незначительным количеством лимфоцитов на фоне хронической эмпиемы плевры. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. $\times 400$.

К окончанию эксперимента (30-е сутки) во всех группах регистрировались случаи ликвидации остаточных полостей, однако в группе НКЭп полость эмпиемы определялась достоверно чаще, чем в группе сравнения и в опытной PRPЭп группе ($p < 0,05$). При этом в НКЭп объем остаточной полости был наибольшим ($19,3 \pm 1,7$ мм³). Отмечалось утолщение париетальной и висцеральной плевры, с субплеврально расположенными абсцессами. У животных данной группы преобладали единичные спайки (50,0%), в 30,0% случаев спайки отсутствовали, множественные спайки обнаружены лишь в 13,3%, тотальное заращение зарегистрировано лишь в 6,6% (рис. 10А).

При введении доксициклина (ГСЭп) объем остаточной полости эмпиемы в среднем составлял $16,5 \pm 1,5$ мм³, заращение остаточной полости обнаружено в 13,3%, в 16,7% определялись единичные спайки, в 46,7% – множественные. Спайки были представлены зрелыми массивными швартами, расположенными в нижних отделах (рис. 10Б).

В опытной группе (PRPЭп) на 30-е сутки тотальное заращение полости эмпиемы зарегистрировано в 13,3%. Объем остаточной плевральной полости в среднем составил $12,1 \pm 0,8$ мм³. Отсутствие спаек за-

регистрировано в 20,0%. Морфологически определялись лентовидные и плоскостные спайки (рис. 10В).

Эффективность плазмы, обогащенной тромбоцитами при внутриплевральном введении для потенцирования адгезиогенеза при травме грудной клетки по результатам гистологического исследования

На 10-е сутки эксперимента в группе НКЭп в плевральной полости определялось пропитывание листков плевры гнойно-фибринозным экссудатом с вовлечением в патологический процесс прилежащих тканей. В воспалительном детрите экссудата определялись отложения нитей фибрина. В париетальной плевре обнаруживались реактивные изменения, характеризующиеся явлениями гиперхромии ядер и нарушениями ядерно-цитоплазматического взаимоотношения. Воспалительный инфильтрат был представлен обилием полиморфно-ядерных нейтрофилов с единичными лимфоцитами и макрофагами. (рис. 11А).

В группе сравнения в остаточной полости ЭП также обнаруживался гнойно-фибринозный экссудат. Выявлены признаки воспаления, заключающиеся в визуализации клеток мезотелия с воспалительными

изменениями. В плевральных сращениях определялись хаотично расположенные соединительнотканые волокна, преимущественно ретикулярные, в толще которых располагались единичные фибробласты и множественные нейтрофильные лейкоциты (рис. 11Б).

В опытной группе остаточная плевральная полость была отграничена от ткани легкого за счет формирования грануляционной ткани, представленной волокнами соединительной ткани с обилием сосудов (рис. 11В).

В группе НКэп на 20-е сутки экспериментальной ЭП выявлена частичная организация экссудата с осадком фибрина и единичных волокон соединительной ткани. Обнаруживались немногочисленные микроабсцессы с тканевым дендритом, расположенном в центре. Отграничение патологического процесса происходило посредством незрелых волокон соединительной ткани, внутри которых отмечалась массивная воспалительная инфильтрация, представленная нейтрофилами с единичными лимфоцитами и макрофагами. Отмечалось несоответствие степени зрелости плевральных сращений срокам эксперимента (рис. 12А).

При введении доксициклина на 20-е сутки эксперимента адгезиогенез имел ряд особенностей, связанных с фрагментацией остаточной полости соединительноткаными сращениями на микрополости, содержащие незначительное количество серозно-гнойного экссудата. Обнаруживаемые спайки были инфильтрированы нейтрофильными лейкоцитами и богато васкуляризованы, что свидетельствовало об активном неоангиогенезе (рис. 12Б).

Введение плазмы, обогащенной тромбоцитами, на данном сроке эксперимента приводило к активному формированию соединительной ткани, представленной сетью рыхло расположенных тонких волокон с явлениями отека. При этом выраженность воспалительной реакции была значительно ниже, чем в группе НКэп и ГСэп. Морфологически определялась умеренная диффузная лимфоцитарная инфильтрация плевральных сращений с единичными нейтрофильными лейкоцитами. Со стороны микроциркуляторного русла были выявлены признаки активного неоангиогенеза, сосуды равномерно располагались среди волокон соединительной ткани (рис. 12В).

При гистологическом исследовании тканей плевральной полости на 30-е сутки в группе негативного контроля наблюдался выраженный отек соединительной ткани, обильно инфильтрированной нейтрофилами, единичными плазмócитами и макрофагами. Мезотелий висцерального и париетального листков не визуализировался, между тонкими тяжами соединительной ткани определялся экссудат, который по своему составу был представлен преимущественно нейтрофилами. Выявлено диффузное пропитывание и утолщение плевральных листков за счет выраженного отека и обильной нейтрофильной

инфильтрации. Сосуды микроциркуляторного русла были умеренного кровенаполнения, с явлениями периваскулярного отека, что гистологически проявлялось разволокнением сосудистой стенки и наличием оптически пустых периваскулярных пространств (рис. 13А).

У животных группы сравнения (на фоне введения доксициклина) отмечалось наличие единичных незрелых спаек в плевральной полости. Спайки были сформированы рыхлой волокнистой соединительной ткани, при этом тонкие соединительнотканые волокна имели различное направление, между которыми выявлялось обилие умеренно полнокровных сосудов. Между волокнами соединительной ткани четко визуализировалось скопление фибробластов, которые имели округлые ядра и незначительное количество цитоплазмы. Кроме этого определялась лимфоцитарная инфильтрация с наличием единичных плазматических клеток. В плевральных сращениях определялись гранулы гемосидерина, а также крупные клетки с наличием в цитоплазме бурого пигмента (сидерофаги). Обращало на себя внимание, что сосуды микроциркуляторного русла были выстланы эндотелиоцитами с округлым ядром, что свидетельствовало о «раздражении» эндотелия и являлось морфологическим признаком эндотелиальной дисфункции (рис. 13Б).

В опытной группе с биологическим потенцированием адгезиогенеза в плевральной полости плазмой, обогащенной тромбоцитами зарегистрировано образование множественных спаек с наличием строго ориентированных соединительно-тканых волокон, где определялись фибробласты и фиброциты с вытянутым ядром и незначительным количеством цитоплазмы. Визуализировались единичные сосуды с эндотелием типичного строения. Морфологические признаки воспаления были минимальны и характеризовались наличием единичных лимфоцитов и плазматических клеток (рис. 13В).

Морфометрическая оценка эффективности плазмы, обогащенной тромбоцитами, для потенцирования адгезиогенеза при хронической эмпиеме плевры в динамике

Сводные данные по результатам проведенного морфометрического исследования у животных с экспериментальной травмой грудной клетки группы НКэп и при различных способах биологической стимуляции адгезиогенеза представлены в табл. 2.

В результате комплексного морфологического исследования установлено, что состав спайки внутри экспериментальных групп значительно варьировал. Так, на протяжении всего наблюдения ОД коллагеновых волокон, формирующих спайки была выше в группе с биологической стимуляцией адгезиогенеза, чем в группе НКэп и в ГСэп. На 10 сут в группе с применением PRP технологий данный показатель был в

7,5 раз выше по сравнению с группой НК ($p < 0,01$). По мере увеличения сроков эксперимента ОД коллагеновых волокон в спайках, формирующихся в группе НК и ГС неуклонно увеличивалась и к 30-ым суткам не имела достоверных отличий от спаек, сформированных при потенцировании адгезиогенеза.

Параллельно с увеличением ОД коллагеновых волокон происходило снижение ОД ретикулярных волокон, что свидетельствовало о созревании спайки. Однако в PRP-группе данный показатель уже на начальных сроках эксперимента был достоверно ниже, чем в группе НК и ГС ($p < 0,05$). Изменения в клеточном составе спаек были менее выраженными, но при этом лейкоцитарная инфильтрация значительно уменьшалась в группе PRPЭп, по сравнению с группой НК и ГС. Так, на 20-е сутки в группе с сочетанной стимуляцией спаек плазмой, обогащенной тромбоцитами ОД лейкоцитов была в 2,1 раза меньше, чем в группе НК. Параллельно с этим происходило увеличение ОД лимфоцитов и ОД фибробластов, которое регистрировалось достоверно раньше (10-20 суток), чем в группе НК.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о более раннем формировании и созревании спаек при биологической стимуляции плазмы, обогащенной тромбоцитами, а также об их стабильности в данной группе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Адгезиогенез представляет собой компенсаторную реакцию, возникающую в ответ на операционную (или иную) травму. В качестве биологической субстанции, обеспечивающей потенцирование адгезиогенеза были выбраны плазма, обогащенная тромбоцитами (PRP-технологии).

Выбор травмы грудной клетки, с множественными флотирующими переломами ребер и остаточной полости при хронической эмпиеме плевры в качестве нозологических единиц для применения биотехнологии в стимуляции адгезиогенеза неслучаен. При травме грудной клетки стимуляция спаечного процесса должна иметь двоякую роль: стабилизация реберного каркаса – с одной стороны и защита легочной паренхимы от повреждения – с другой. При эмпиеме плевры заращение остаточной полости соединительной тканью приводит к ее облитерации и ликвидации хронического очага гнойной инфекции.

Согласно данным литературы, использование плазмы, обогащенной тромбоцитами, является патогенетически обоснованной, т.к. тромбоциты содержат факторы роста (PDGF, VEGF, EGF, FGF и др.) которые повышают активность фибробластов. Фибробласты продуцируют эластин, коллаген, гиалуроновую кислоту, способствуя образованию соединительной ткани и ее неоваскуляризации. Кроме этого факторы роста сдерживают уменьшение объема костной ткани за счет стимуляции пролиферации

остеобластов и блокирования остеокластов. Имеются сведения об иммуностимулирующем действии PRP, участие в нормализации метаболических процессов, тканевого дыхания, оптимизации микроциркуляции [15, 16].

При травме грудной клетки нами разработана модель стабилизации реберного каркаса путем стимуляции адгезиогенеза с использованием плазмы, обогащенной тромбоцитами. Данная модель является патогенетически обоснованной, обладает валидностью и дает возможность оценить морфологическое строение спаек, формирующихся под действием тромбоцитарных факторов роста. При моделировании и лечении экспериментальной травмы грудной клетки с множественными переломами ребер установлены достоверные отличия в группе негативного контроля и в опытной группе. При оценке выраженности спаечного процесса установлено, что наиболее часто спайки визуализируются в местах перелома ребер (от 13,3 до 40%). При этом в группе НК преобладали единичные спайки (23,3–63,3%), в то время как в экспериментальной группе на 20-е и 30-е сутки единичные спайки отсутствовали ($p < 0,01$). Аналогичные результаты получены при анализе случаев отсутствия спаек: в группе НК на всех сроках эксперимента определялись животные без спаек в плевральной полости (16,7% на 10-е, 20-е сутки; 13,3% – на 30-е сутки). В то время как в группе с PRP-технологией, процент крыс без спаек в плевральной полости был достоверно ниже: от 6,7% на 10-е сутки, 3,3% – на 20-е сутки, до 0% на 30-е сутки ($p < 0,05$).

Обращает на себя внимание макроскопические различия в строении спаек, в группе НК преобладали паутинные и пленчатые спайки, в то время как в экспериментальных группах преобладали лентовидные и плоскостные спайки. Толщина и плотность спаек нарастала по мере увеличения сроков эксперимента во всех исследуемых группах.

Итак, проведенное исследование позволяет прийти к выводу, что биологическое потенцирование спайкообразования является логичной мерой стабилизации при травмах грудной клетки с множественными переломами ребер. Морфологическим субстратом данного способа является образование зрелых сращений без проявлений активности и дальнейшего развития, подтверждая тем самым зрелость и сформированность спаек. Полученные результаты согласуются с данными литературы, согласно которым применение PRP-технологии оказывает стимулирующее действие на развитие и неоваскуляризацию спаек за счет содержащихся факторов роста, кроме этого, имеются сведения о стимулирующем влиянии PRP-технологии на формирование костной мозоли [17].

При моделировании и лечении экспериментальной эмпиемы плевры применили авторскую методику биологической стимуляции адгезиогенеза путем

введения плазмы, обогащенной тромбоцитами. В основе ликвидации остаточной плевральной полости лежит стимуляция спайкообразования факторами роста, содержащимися в PRP, что согласовывается с литературными данными [18, 19].

При этом установлены достоверные различия в морфогенезе остаточных полостей у животных группы НК, групп сравнения и экспериментальной группы. Обращает на себя факт, что в группе сравнения (лечение доксициклином) спайки состояли преимущественно из рыхлой волокнистой соединительной ткани, инфильтрированной клеточными элементами, что подтверждало факт воспалительного процесса в спайке и является прогностически неблагоприятным в плане возникновения полной облитерации спайками плевральной полости. В то же время в экспериментальной группе внутриплевральные сращения были сформированы преимущественно волокнами соединительной ткани, содержащей в своем составе лимфоциты, гистиоциты, фибробласты, незначительным количеством запустевших сосудов, признаков вос-

паления не выявлялось. Описанная гистологическая картина характерна для зрелых сращений, а значит, при адресном введении PRP в плевральную полость, адгезиогенез может быть признан контролируемым.

Итак, в эксперименте установлено, что применяемые биотехнологии дают возможность потенцировать внутриплевральные сращения при остаточных полостях при хронической эмпиеме плевры, что приводит к заращению, вплоть до полной облитерации полости эмпиемы – хронического источника инфекции и фактора риска рецидива заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного экспериментального исследования доказана эффективность применения плазмы, обогащенной тромбоцитами, для биологического потенцирования адгезиогенеза при экспериментальных травмах грудной клетки и хронической эмпиеме плевры. Полученные результаты могут быть достаточным основанием для рекомендации к проведению клинических исследований.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо 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. Ахмеров Р.Р. Применение тромбоцитарной аутоплазмы при лечении гонартрозов и коксартрозов / Р.Р. Ахмеров, Р.Ф. Зарудий, З.М. Аминова, А.Л. Емелин, М.В. Овечкина // *Практ. медицина*. – 2013. – Т. 1. – № 2(2). – С. 17–20.
2. Jhang J.F. Repeated intravesical injections of platelet-rich plasma are effective in the treatment of interstitial cystitis: a case control pilot / J.F. Jhang, S.Y. Wu, T.Y. Lin, H.C. Kuo // *Low Urin Tract Symptoms*. – 2017. DOI: 10.1111/luts.12212.
3. Cieslik-Bielecka A. The application of L-PRP in AIDS patients with crural chronic ulcers: A pilot study / A. Cieslik-Bielecka, R. Skowroński, M. Jędrusik-Pawłowska, M. Pierchała // *Adv Med Sci*. – 2017 – V. 63. – N 1. – P. 140–146. DOI: 10.1016/j.advms.2017.10.002.
4. Sakakura N. Surgical treatment of empyema after pulmonary resection using pedicle skeletal muscle plumbage, thoracoplasty, and continuous cavity ablation procedures: a report on three cases / N. Sakakura, T. Mizuno, H. Kuroda, Y. Sakao, T. Uchida // *J Thorac Dis*. – 2016. – N 6. – P. 1333–9. DOI: 10.21037/jtd.2016.04.04.
5. Botianu P.V. Muscle flaps and thoracomyoplasty as a redo procedure for postoperative empyema / P.V. Botianu, A.M. Botianu, V.C. Bacarea // *Thorac Cardiovasc Surg*. – 2016. – V. 64. – N 3. – P. 252–7. DOI: 10.1055/s-0034-1387820.
6. Жестков К.Г. Национальные клинические рекомендации по лечению спонтанного пневмоторакса] / К.Г. Жестков, Б.Г. Барский, М.А. Атюков, А.А. Пичуров / Москва, РФ. – 2014. – 23 с.
7. MacDuff A. Management of spontaneous pneumothorax: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010 / A. MacDuff, A. Arnold, J. Harvey // *Thorax*. – 2010. – V. 65. – N 2. – P. 18–31. DOI: 10.1136/thx.2010.136986.
8. Рыбакова, А.В. Методы эвтаназии лабораторных животных в соответствии с европейской директивой 2010/63 / А.В. Рыбакова, М.Н. Макарова // *Международный вестник ветеринарии*. – 2015. – №2. – С. 96–107.
9. Рыбакова, А.В. Санитарный контроль экспериментальных клиник (вивариев) в соответствии с локальными и международными требованиями / А.В. Рыбакова, М.Н. Макарова // *Международный вестник ветеринарии*. – 2015. – №4. – С. 81–89.
10. Song K.S. Chemical pleurodesis using doxycycline and viscum album extract / K.S. Song, D. Keum, J.B. Kim // *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. – 2017. V. 50 – N 4 – P. 281–286. DOI: 10.5090/kjtc.2017.50.4.281.
11. Thomas R. Intrapleural fibrinolysis for the treatment of indwelling pleural catheter-related symptomatic loculations: a multicenter observational study / R. Thomas, F. Piccolo, D. Miller, P.R. MacEachern Chee, A.C. Huseini // *Chest*. – 2015. – V. 148. – N 3. – P. 746–51. DOI: 10.1378/chest.14-2401.
12. Boshuizen R.C. A randomized controlled trial comparing

- indwelling pleural catheters with talc pleurodesis (NVALT-14) / R.C. Boshuizen, V.Vd. Noort, J.A. Burgers, G.J.M. Herder, S.M.S. Hashemi, T.J.N. Hiltermann // *Lung Cancer*. – 2017. – V. 108. – N 9. – P. 14. DOI: 10.1016/j.lungcan.2017.01.019.
13. Воробьев А.А., Бебуришвили А.Г. Хирургическая анатомия оперированного живота и лапароскопическая хирургия спаек: Волгоград, РФ: Издатель; 2001. 230 с.
 14. Автандилов, Г. Г. Основы количественной патологической анатомии. – М.: Медицина, 2002. – 240 с.
 15. Bohlen H.L. Platelet-Rich Plasma Is an Equal Alternative to Surgery in the Treatment of Type 1 Medial Epicondylitis / H.L. Bohlen, Z.E. Schwartz, V.J. Wu, S.G. Thon, Z.J. Finley, M.J. O'Brien, F.H. Savoie // *Sports Med.* – 2020. – V. 8. – N 3. – P. 2325967120908952. DOI: 10.1177/2325967120908952.
 16. Picard F. Platelet-rich plasma-enriched autologous fat graft in regenerative and aesthetic facial surgery: Technical note / F. Picard, B. Hersant, S. La Padula, J.P. Meningaud // *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* – 2017. – V. 118. – N 4. – P. 228–231. DOI: 10.1016/j.jormas.2017.05.005.
 17. Блаженко, А.Н. Применение обогащённой тромбоцитами плазмы для стимуляции репаративного остеогенеза на ранней стадии формирования костной мозоли / А.Н. Блаженко, М.Л. Муханов, Е.Г. Лысых, А.С. Самойлова // *Современные проблемы науки, технологий, инновационной деятельности: сб. трудов по матер. междунар. науч.-практич. конф. Белгород: Агентство перспективных научных исследований.* – 2017. – С. 9–12.
 18. Корымасов, Е.А. Национальные клинические рекомендации «Эмпиема плевры» / Е.А. Корымасов, П.К. Яблонский, Е.Г. Соколов, В.В. Лищенко, И.Я. Мотус, С.А. Скрыбин. – 2015. – 33 с.
 19. Ачкасов, Е.Е. Применение аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в клинической практике / Е.Е. Ачкасов, Э.Н. Безуглов, А.А. Ульянов // *Биомедицина.* – 2013. – №4. – С. 46–59.

АВТОРЫ

Калашников Антон Владимирович – кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой хирургических дисциплин Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: orcid.org/0000-0002-7688-9366. E-mail: cos@pmedpharm.ru

Воробьев Александр Александрович – заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии и топографической анатомии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-8378-0505. E-mail: cos@volgmed.ru

Калашникова Светлана Александровна – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой морфологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: orcid.org/0000-0002-7688-9366. E-mail: kalashnikova-sa@yandex.ru

Салимов Дмитрий Шамильевич – кандидат медицинских наук, начальник II хирургического отделения Федерального казенного учреждения «Центральный военный клинический госпиталь имени П.В. Мандрыка» Министерства обороны Российской Федерации. ORCID ID: orcid.org/0000-0001-8647-1505. E-mail: salimow.dmitry@yandex.ru

УДК: 615.225



ИЗУЧЕНИЕ АНТИАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОЙ И ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДНЫХ АГОНИСТОВ ГЕТЕРОРЕЦЕПТОРА EPOR/CD131

Пученкова О.А.¹, Надеждин С.В.¹, Солдатов В.О.², Жученко М.А.³, Коршунова Д.С.², Кубекина М.В.², Коршунов Е.Н.², Корокина Л.В.¹, Голубинская П.А.⁴, Куликов А.Л.¹, Гуреев В.В.¹, Покровский В.М.¹, Патраханов Е.А.¹, Лебедев П.Р.¹, Денисюк Т.А.⁵, Беляева В.С.¹, Мовчан Е.А.¹, Лепетуха Е.И.¹, Покровский М.В.¹

¹ ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85

² ФГБУН «Институт биологии гена РАН», 119334, Россия, г. Москва, ул. Вавилова, 34/5

³ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 123098, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, 1

⁴ Клинико-диагностическая лаборатория, Бюджетное учреждение здравоохранения Воронежской области «Воронежская областная клиническая офтальмологическая больница» (БУЗ ВО «ВОКОБ»), 394030, Россия, г. Воронеж, ул. Революции 1905 года, д. 22

⁵ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», 305041, Россия, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3

E-mail: zinkfingers@gmail.com

Получено 14.11.2019

Рецензия (1) 23.12.2019

Рецензия (2) 25.12.2019

Принята к печати 30.12.2019

Введение. Препараты, воздействующие на митохондриальную дисфункцию, оксидативный стресс, апоптоз и воспаление сосудистой стенки, обладают высоким потенциалом при профилактике и лечении атеросклеротических поражений. В этой связи применение агонистов гетерорецептора EPOR/CD131, которые обладают подобным спектром фармакологических эффектов, является одной из перспективных стратегий в лечении кардиоваскулярных заболеваний.

Материалы и методы. Исследование было проведено на 68 самцах мышей C57Bl/6J. Атеросклероз моделировали на трансгенных животных с эндотелиоспецифичным нокаутном гена *Polg* путем моделирования баллонной травмы и содержания на западной диете. Затем в течение 27 дней вводили изучаемые препараты 1 раз в 3 дня в дозе 20 мкг/кг. На 28-й день животных эвтаназировали и оценивали площадь атеросклеротических бляшек. Также в тканях аорты определяли экспрессию генов, связанных с процессами воспаления, антиоксидантной защиты, апоптоза, ангиогенеза. Кроме того, было изучено эндотелиопротективное действие пептидов на первичных культурах эндотелиоцитов диких и трансгенных мышей *Polg-D257A*.

Результаты. Мы не обнаружили статистически значимого влияния препаратов на площадь липидной инфильтрации. Однако исследуемые пептиды значительно уменьшили экспрессию провоспалительных генов *iNos*, *Icam1*, *Vcam1*, *Sele*, *Il6*, *Tnfa*, генов, связанных с ангиогенезом *Vegfa*, *Flt-1* и *Hif1a*, экспрессию проапоптотических факторов и более чем в 1,5 раза снизили соотношение *Bax/Bcl-2*. Кроме того, пептиды дозозависимо увеличили выживаемость эндотелиоцитов при добавлении H₂O₂ in vitro.

Заключение. Используемые пептиды на основе эритропоэтина способны улучшать функциональное состояние сосудистой стенки на фоне атеросклеротического поражения и оказывают угнетающее влияние на патобиологические процессы, связанные с митохондриальной дисфункцией. Кроме того, исследуемые пептиды оказывают значимый эндотелиопротективный эффект при индукции оксидативного стресса in vitro.

Ключевые слова: атеросклероз, производные эритропоэтина, митохондриальная дисфункция, оксидативный стресс.

Для цитирования: Пученкова О.А., Надеждин С.В., Жученко М.А., Коршунова Д.С., Кубекина М.В., Коршунов Е.Н., Корокина Л.В., Голубинская П.А., Куликов А.Л., Гуреев В.В., Покровский В.М., Патраханов Е.А., Лебедев П.Р., Денисюк Т.А., Беляева В.С., Мовчан Е.А., Лепетуха Е.И., Покровский М.В. Изучение антиатеросклеротической и эндотелиопротективной активности пептидных агонистов гетерорецептора EPOR/CD131. *Фармация и фармакология*. 2020;8(2):100-111. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-100-111

© Пученкова О.А., Надеждин С.В., Жученко М.А., Коршунова Д.С., Кубекина М.В., Коршунов Е.Н., Корокина Л.В., Голубинская П.А., Куликов А.Л., Гуреев В.В., Покровский В.М., Патраханов Е.А., Лебедев П.Р., Денисюк Т.А., Беляева В.С., Мовчан Е.А., Лепетуха Е.И., Покровский М.В., 2020

For citation: Puchenkova O.A., Nadezhdin S.V., Soldatov V.O., Zhuchenko M.A., Korshunova D.S., Kubekina M.V., Korshunov E.N., Korokina L.V., Golubinskaya P.A., Kulikov A.L., Gureev V.V., Pokrovskiy V.M., Patrakhanov E.A., Lebedev P.R., Denisyuk T.A., Belyaeva V.S., Movchan E.A., Lepetukha E.I., Pokrovskiy M.V. Study of antiatherosclerotic and endothelioprotective activity of peptide agonists of EPOR/CD131 heteroreceptor. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(2):100-111. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-100-111

STUDY OF ANTIATHEROSCLEROTIC AND ENDOTHELIOPROTECTIVE ACTIVITY OF PEPTIDE AGONISTS OF EPOR/CD131 HETERORECEPTOR

Puchenkova O.A.¹, Nadezhdin S.V.¹, Soldatov V.O.², Zhuchenko M.A.³, Korshunova D.S.², Kubekina M.V.², Korshunov E.N.², Korokina L.V.¹, Golubinskaya P.A.⁴, Kulikov A.L.¹, Gureev V.V.¹, Pokrovskiy V.M.¹, Patrakhanov E.A.¹, Lebedev P.R.¹, Denisjuk T.A.⁵, Belyaeva V.S.¹, Movchan E.A.¹, Lepetukha E.I.¹, Pokrovskiy M.V.¹

¹Belgorod State National Research University, 85, Pobeda Str., Belgorod, 30801

²Federal Publicly Funded Institution of Science "Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences", 34/5, Vavilov Str., Moscow, Russia, 11933

³Russian Research Center "Kurchatov Institute" – State Science Research Institute of Genetics, 1, Academician Kurchatov Square, Moscow, Russia, 123098

⁴Clinical diagnostic laboratory, Budgetary institution of public healthcare of the Voronezh Region "Voronezh Regional Clinical Ophthalmological Hospital", 22, Revolution of 1905 Str., Voronezh, Russia, 394030

⁵Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Kursk State Medical University", 3, Karl Marx Str., Kursk, Russia, 305041

E-mail: zinkfingers@gmail.com

Received 14 November 2019 Review (1) 23 December 2019

Review (2) 25 December 2019

Accepted 30 December 2019

Introduction. The drugs affecting a mitochondrial dysfunction, oxidative stresses, apoptosis and inflammation of the vascular wall, have a high potential for the prevention and treatment of atherosclerotic lesions. In this regard, the use of EPOR/CD131 heteroreceptor agonists which have a similar spectrum of pharmacological effects, is one of the promising strategies in the treatment of cardiovascular diseases.

Materials and Methods. The study was carried out on 68 C57Bl/6J male mice. Atherosclerosis was simulated in transgenic animals with an endotheliospecific knockdown of the *Polg* gene by simulating a balloon injury and keeping on a Western diet. Then, the studied drugs were injected once every 3 days at the dose of 20 µg/kg for 27 days. On the 28-th day, the animals were euthanized and the area of atherosclerotic plaques was assessed. The gene expression associated with the processes of inflammation, antioxidant protection, apoptosis, and angiogenesis was also determined in the aortic tissues. In addition, the endothelium protective effect of peptides on primary cultures of endothelial cells of wild and transgenic *Polg-D257A* mice was studied.

Results. No statistically significant effect of drugs on the area of lipid infiltration have been found. However, the studied peptides have significantly reduced the expression of proinflammatory genes (*iNos*, *Icam1*, *Vcam1*, *Sele*, *Il6*, *Tnfa*), the genes associated with angiogenesis (*Vegfa*, *Kdr*, and *Hif1a*), the expression of proapoptotic factors; they decreased the Bax/Bcl-2 ratio by more than 1.5 times. In addition, when supplemented with H₂O₂ in vitro, peptides dose-dependently increased endothelial cell survival.

Conclusion. The erythropoietin-based peptides can be used to improve the functional state of the vascular wall against the background of atherosclerotic lesions and have a depressing effect on pathobiological processes associated with a mitochondrial dysfunction. In addition, the studied peptides have a significant endothelial protective effect in the induction of oxidative stress in vitro.

Keywords: atherosclerosis, erythropoietin derivatives, mitochondrial dysfunction, oxidative stress.

ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз – хроническое заболевание стенок сосудов, характеризующееся асептическим воспалением, нарушением перфузии органов и тканей, склонностью к тромбообразованию и прогрессирующей с возрастом дисфункцией сосудистой стенки. В 1912 г. на заседании Общества русских врачей в Санкт-Петербурге крупный российский ученый Н.Н. Аничков, именем которого в настоящее время названа премия за самые выдающиеся исследования в области атеросклероза, совместно с С.С. Халатовым представил первые результаты своих революционных исследований, касающихся выявлению

связи между алиментарными факторами, уровнем холестерина крови и атеросклерозом. Со времен этих работ, атеросклероз рассматривается, в первую очередь, как заболевание, вызванное накоплением в сосудистой стенке холестерина [1]. Эта концепция до сих пор является ключевой для снижения кардиоваскулярного риска. Тем не менее, сейчас общепризнано, что дислипидемия является единственной причиной атеросклероза только при семейных гиперхолестеринемиях. В других случаях атеросклероз – это результат совокупного действия ряда патогенетических факторов, среди которых выделяют эндотелиальную дисфункцию [2], гемодинамическую пере-

грузку [3–5], миграцию гладкомышечных клеток [6], хроническое стерильное воспаление сосудов и ряд других процессов.

Отдельное место в патобиологии атеросклероза отводится нарушению работы митохондрий [7]. Митохондрии являются главным генератором активных форм кислорода (АФК) в клетке. Например, известно, что, проходя по окислительно-восстановительному градиенту электронно-транспортной цепи, 1–3% электронов преждевременно реагируют с кислородом в комплексах I и III с образованием супероксида и других типов АФК [8]. При разных патологических состояниях, включая гипоксию и воспаление, их количество может увеличиваться. Кроме того, митохондрии выполняют в сосудистых клетках не только метаболическую, но также важную регуляторную и сигнальную роль [8].

Немаловажно также, что дисфункция митохондрий в других клетках, включая нейроны и кардиомиоциты приводит к снижению их резистентности к ишемии, что выражается в увеличении летальных исходов на фоне мозгового инсульта, окклюзии коронарных артерий, инфаркте почек и других органов. В связи с обозначенными сведениями, патогенетический каскад, объединяющий митохондриальную дисфункцию и атеросклероз, становится актуальной мишенью для фармакологического воздействия.

В качестве перспективного терапевтического подхода для воздействия на митохондриальное звено при поражении сосудистой стенки, могут быть рассмотрены агонисты гетеродимерного рецептора эритропоэтина EPOR/CD131. Первым препаратом из данной группы был 11-аминокислотный пептид rHBSP (pyroglutamate helix B surface peptide), открытый в 2008 г. научной группой под руководством Майкла Брайнса [9]. Прежде мы продемонстрировали, что данный пептид оказывает выраженное эндотелиопротективное действие при моделировании L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции у крыс [10, 11]. Однако в этом исследовании нами также был выявлен побочный эффект в виде протромботического действия. В этой связи мы попробовали модернизировать данную молекулу путем добавления трипептидных мотивов, обладающих антиагрегантным действием. В результате было получено два принципиально новых соединения, сочетающих в себе цитопротективный [12] и антиагрегантный (собственные неопубликованные данные) эффекты. Здесь мы сообщаем о результатах изучения антиатеросклеротической активности этих соединений.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ – оценка антиатеросклеротических и эндотелиопротективных свойств коротких пептидных производных эритропоэтина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и диета

В качестве основной тест-системы были использованы мыши C57Bl/6J. Животные были переданы в дар ЦКП Института биологии гена РАН и содержа-

лись в центре доклинических исследований НИИ Фармакологии живых систем. После прохождения 14-дневного карантинного режима мыши были стратифицированы по массе и рассажены в отдельные конвенциональные клетки в соответствии с принадлежностью к экспериментальной группе. До и во время выполнения исследования животные содержались в помещениях с искусственным освещением (режим 12 ч. / 12 ч.) при температуре 21–23°C, влажности 38–50% и имели свободный доступ к корму и воде. Номер заключения независимого этического комитета 06-09/02-1 от 16.12.2019 г.

В исследование было включено 16 самцов дикого типа и 52 самца (25–30 г) с генотипом Polg-D257A/Cdh5-CRE на фоне C57Bl/6J. Генотип ассоциирован с эндотелиоспецифичным нокдауном гена Polg, кодирующего фермент полимераза гамма. Нарушения в работе данного фермента приводят к развитию митохондриальной дисфункции [13, 14]. Данная линия была создана в ЦКП «Геномное редактирование» ИБГ РАН для изучения эффектов оксидативного стресса и митохондриальной дисфункции. Линия характеризуется наличием мутантной формы гена Polg под контролем CAG промотора и стоп-кассеты, фланкированной LoxP-сайтами (неопубликованные данные), принципиальное устройство конструкции описано в статье [15]. После скрещивания с мышами Cdh5-CRE происходит эндотелиоспецифичное удаление стоп-касеты и гиперэкспрессия мутантной формы Polg в эндотелии.

За 2 недели до операции животных помещали на западную диету с 2% содержанием холестерина.

При работе соблюдались требования Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 24.06.1998 года, правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ Р 53434-2009), директивы Европейского сообщества (86/609 EC), правил Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997) и Правил лабораторной практики, принятых в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 708 от 29.08.2010 г.).

Хирургические процедуры

Операцию выполняли на подогревочном столике под препаративным микроскопом. Под наркозом (Золазепам (Virbac (Россия)) 2,5 мг/100 г + Ксилазин (Биогель (Беларусь)) 2 мг/100 г внутривенно) животным после выполнения срединной лапаротомии выделяли аорту на уровне между бифуркацией и отхождением почечных артерий.

На обнаженный сосуд накладывали две клипсы, надсекали между ними артериальную стенку и вводили начальный участок баллонного катетера (рис. 1). Затем снимали проксимальную клипсу и продвигали катетер в краниальном направлении на 10 мм.

После этого на 40 секунд нагнетали в баллон катетера воду, раздувая его до диаметра 1,5 мм при давлении 10 бар. Наконец, катетер извлекали, на разрез в аорте накладывали три шва, рану ушивали. После операции животных помещали в индивидуальные клетки с простерилизованным бумажным подстилом и наблюдали за ними до пробуждения.

Для облегчения послеоперационного болевого синдрома в течение 3 дней с момента операции животные получали Метамизол натрия (Фармстандарт-Лексредства (Россия)) с питьевой водой *ad libitum* в концентрации 50 мг вещества на 100 мл воды [16, 17].

Дизайн эксперимента и введение препаратов

Животные с генотипом *Polg*^{D257A}/*Cdh5*-CRE были разделены 5 равных групп:

1) Интактные – животные без моделирования патологии и без введения препаратов (n=12);

2) Контроль – животные с моделированием патологии (баллонная травма + западная диета с повышенным содержанием холестерина), которым, начиная с 1-го дня, вводили воду для инъекций подкожно в объеме 0,1 мл/10 г (n=12);

3) *P-αB* – животные, с моделированием патологии, которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид *P-αB* (ООО «Фармапарк») подкожно в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 27 дней (суммарная доза 180 мкг/кг) (n=12);

4) *P-αB1* – животные, с моделированием патологии, которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид *P-αB1* (ООО «Фармапарк») подкожно в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 27 дней (суммарная доза 180 мкг/кг) (n=12);

5) *P-αB3* – животные, с моделированием патологии, которым, начиная с 1-го дня вводили пептид *P-αB3* (ООО «Фармапарк») подкожно в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 27 дней (суммарная доза 180 мкг/кг) (n=12) (табл. 1).

Измерение площади атеросклеротической бляшки

Четверым животным из каждой группы было выполнено макроскопическое изучение атеросклеротических бляшек аорты. Вкратце, на 28-й день после моделирования баллонной травмы животных эвтаназировали передозировкой наркоза (Золазепам (Virbac (Россия)) 10 мг/100 г внутривенно) и аккуратно извлекали брюшную аорту от бифуркации до участка на уровне диафрагмы.

Затем препараты продольно рассекали, расправляли на пенопластовой подложке, промывали 50% раствором этанола и погружали в раствор Oil Red O на 15 минут. После этого препараты промывали дистиллированной водой и делали цифровые фотоснимки. На полученных снимках с использованием программы imageJ рассчитывали отношение площа-

ди атеросклеротической бляшки (окрашенной красным) к интактной ткани.

Количественная ПЦР

У остальных животных после эвтаназии ткань аорты в области нанесения баллонного повреждения забирали, гомогенизировали и 10 минут инкубировали при 37°C в растворе «Extract RNA». После лизирования образца в реагенте его подвергли хлороформной очистке, надосадочную пробу собирали и промывали изопропиловым спиртом и 70%-ным этиловым спиртом. Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре IMPLENNanoPhotometer® и доводили до концентрации 300 нг/мкл.

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLVRTSK021 в соответствии с протоколом фирмы-производителя (Evrogen). Смесь аккуратно перемешивали и в течение 2 минут прогревали при 70°C для расплавления вторичных структур РНК и последующего отжига праймера OligoDT. После переносили образцы в лед. Всю реакционную смесь инкубировали 60 мин при 40°C в термоциклере T100™ ThermalCycler (Bio-Rad).

Для остановки реакции прогревали смесь при 70°C в течение 10 минут. Полученную кДНК разводили до концентрации 1 нг/мкл. Уровень экспрессии гена оценивали относительно значений референсного гена *Gapdh*. Расчет экспрессии в конкретной точке производился по формуле: Экспрессия гена = $[(Ct(Gapdh)/Ct(Ген интереса))]$ (таб. 2).

In vitro изучение цитопротективной активности

У 6-ти интактных мышей (4 животных генотипом *Polg*^{D257A}/*Cdh5*-CRE и 4 животных дикого типа) после эвтаназии в стерильных условиях выделяли нижнюю полую вену и промывали раствором DPBS (Thermo FS) до полного удаления крови. Затем вену надсекали для обнажения внутренней поверхности и помещали в 0,2% раствор коллагеназы в DPBS с добавлением 0,9 mM $CaCl_2$, 0,493 mM $MgCl_2$, 5,56 mM глюкозы, 0,327 mM пирувата натрия, пенициллина и стрептомицина (Lonza), подвергая интиму ферментативной диссоциации. Для увеличения эффективности отделения эндотелиоцитов внутренний слой отслаивали стерильным пинцетом. Раствор коллагеназы, содержащий клетки, собирали в пробирку 5 мл, полученные эндотелиальные клетки культивировали в среде DMEM-F12 (Lonza) с добавлением 20 mM буфера HEPES (Lonza), 5 ЕД/мл гепарина, 200 мкг/мл ECGF (Sigma-Aldrich), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Thermoscientific,) при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2 [18].

Жизнеспособность клеток измеряли количественным колориметрическим анализом МТТ, который обеспечивает чувствительные измерения метаболических статусов клеток, в частности митохондриального статуса, которые могут отражать ранние окислительно-восстановительные изменения.

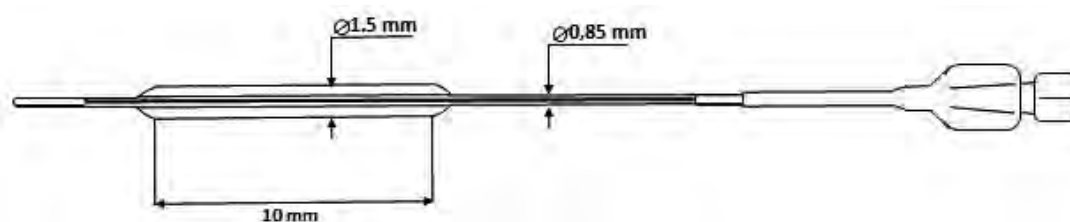


Рисунок 1 – Схематическое изображение и размеры баллонного катетера

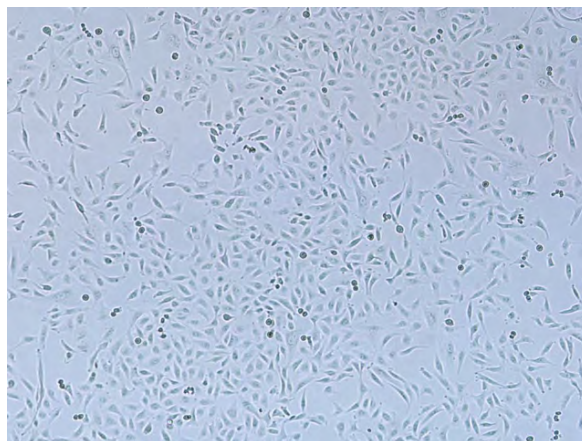


Рисунок 2 – Первичный монослой эндотелиальных клеток мыши (ув. x40)

Таблица 1 – Аминокислотная последовательность исследуемых соединений

Лабораторный шифр	Аминокислотная последовательность
P-αB	____QEQLERALNSS
P-αB1	RGDQEQLERALNSS
P-αB3	KGDQEQLERALNSS

Таблица 2 – Праймеры, используемые для количественной ПЦР

Ген	F-праймер	R-праймер	Длина продукта (п.н.)	GenBank
Trp53 (p53)	CGACTACAGTTAGGGGGGCAC	CCATGGCAGTCATCCAGTCT	95	NM_001127233.1
Bcl2	TCACCCCTGGTGGACAACAT	TTCCACAAAGGCATCCCAGC	102	NM_009741.5
Bax	CCCGAGCTGATCAGAACCAT	GAGGCCTTCCCAGCCAC	96	NM_007527.3
Pon2	CTTCCACACTGCCACCTGAT	TCCTGGGAATTTAGACCCACA	105	NM_000305.3
Sod2	GGCTGGCTTGGCTTCAATAAG	AGCGGAATAAGGCCTGTTGTT	95	NM_013671.3
Vegfa (VEGF-A)	GGGCCTCCGAAACCATGAA	TGCAGCCTGGGACCACTTG	95	NM_001025250.3
Flt-1 (VEGF)	CCCATCGGCAGACCAATACA	CGGTGCAGTTGAGGACAAGA	96	NM_001363135.1
Nos2 (iNOS)	GCTCTAGTGAAGCAAAGCCCA	GGGATTCTGGAACATTCTGTGC	103	NM_001313921.1
Icam1	CTCCGGACTTTTCGATCTTCCA	CCTTCCAGGGAGCAAAACAAC	98	NM_010493.3
Vcam1	TACTGTTTGCAGTCTCTCAAGC	CGTAGTGCTGCAAGTGAGGG	101	NM_011693.3
Sele (E-selectin)	GGGAAGAAGACTGTCTAGCC	AGGGGAGCTGGCTTCCTAAG	96	XM_006496715.3
Hif1a	AGAACAACCTTGAGCTGGCGT	TGGAGGTGAACTAGGCTCTGT	103	NM_001092957.1
Casp1 (Каспаза-1)	TGTATTACAGCCCTGTTGGA	CCCTCAGGATCTTGTCAGCC	100	NM_009807.2
Casp3 (Каспаза-3)	GCTTGAACGGTACGCTAAG	CTTGCTCCCATGTATGGTCTT	105	NM_001284409.1
Il6	GACTGGGGATGTCTGTAGCTC	TGGATGGAAGTCTCTTGCAG	103	NM_001314054.1
Tnfa (TNFα)	ACTGAACTTCGGGGTGATCG	ACTTGGTGGTTTGTGAGTGTG	105	NM_001278601.1
Gapdh	GGGTCCCAGCTTAGGTTTCATC	CCCAATACGGCCAATCCGT	100	NM_001289726.1

Вкратце, экспоненциально растущие клетки высевали в 96-луночный планшет с плотностью 4×10^4 клеток на лунку. Затем клетки обрабатывали исследуемыми пептидами (P- α B, P- α B1, P- α B3 (ООО «Фармапарк»)) в 3 концентрациях – 5, 30, 50 мкг/мл в течение 2 часов. После предварительной обработки в культуральную среду добавляли H_2O_2 до конечной концентрации в конечной концентрации 200 мкМ в течение 24 часов. Клетки отрицательного контроля обрабатывали только H_2O_2 , а клетки положительного контроля не обрабатывали ничем. После инкубации в течение 24 часов в каждую лунку добавляли 10 мкл реагента набора для анализа МТТ и клетки инкубировали в течение дополнительного часа. Поглощение каждого продукта реакции измеряли с помощью микропланшет-ридера на длине волны 450 нм. Результаты выражены в процентах от поглощения МТТ контрольных клеток, который был принят за 100% (рис. 2).

Статистическая обработка

Полученные данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Данные с нормальным распределением сравнивали между собой с применением One-way ANOVA с пост-хок анализом по HSD Тьюки. Данные с ненормальным распределением сравнивали с применением теста Крускала-Уоллеса и пост-хок анализом по методу Данна.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Макроскопическая оценка бляшки

При макроскопическом анализе было обнаружено, что к 28-му дню после моделирования баллонной травмы во всех препаратах аорты, окрашенных краской Oil Red O визуализировались липидные отложения, характерные для атеросклероза.

В то же время степень повреждения очень сильно варьировала внутри групп, что затруднило интерпретацию полученных результатов. В итоге мы не обнаружили достоверных различий между контрольной группой и группами с применением тестируемых препаратов, хотя некая тенденция к снижению площади наблюдалась в группе с применением P- α B1 (рис. 3).

Количественная ПЦР

С использованием молекулярно-биологического анализа тканей бляшки было обнаружено, что изучаемые пептиды выраженно снижают экспрессию проапоптотических факторов Вах, каспазы 1 и каспазы-3, а также незначительно увеличивают экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2. Как видно из тепловой карты на рисунке 2 наибольший эффект продемонстрировал препарат P- α B1 (рис. 4А).

Для интегральной оценки проапоптотической направленности тканей мы рассчитали соотношение экспрессии Вах к Bcl-2. Средний расчетный пока-

затель Вах/Bcl-2 составил 0,67 в группе интактных животных, 1,81 в контрольной группе, 1,19 в группе с применением P- α B, 0,96 в группе с применением P- α B1 и 1,09 в группе с применением P- α B3 (рис. 4Б).

Наряду с антиапоптотическим действием, изучаемые препараты снизили повышенную на фоне травмы экспрессию генов воспалительных маркеров iNOS и молекул межклеточной адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина. Наиболее выраженный эффект был получен в группе с применением соединения P- α B1 (рис. 5).

Кроме того, исследуемые препараты снизили экспрессию факторов, связанных с ангиогенезом VEGF-A, VEGFR, а также HIF-1 α (рис. 6).

Наконец, нами было обнаружено, что на фоне моделирования атеросклероза у мышей *Polg*^{D257A}/*Cdh5-CRE* происходит увеличение экспрессии генов антиоксидантных ферментов PON2, SOD2. При этом по сравнению с контролем на фоне применения тестируемых пептидов экспрессия генов антиоксидантной системы была снижена. Также, как и при оценке влияния пептидов на провоспалительные и проангиогенные гены, наиболее выраженный эффект был получен в группе с применением соединения P- α B1 (рис. 7).

Изучение цитопротекторной активности in vitro

При проведении МТТ-теста на первичных культурах эндотелиоцитов было обнаружено, что даже без добавления H_2O_2 эндотелиоциты, экспрессирующие *Polg*^{D257A}, характеризуются более низкой интенсивностью сигнала по сравнению с диким типом. При инкубации с H_2O_2 большая часть эндотелиоцитов *Polg*^{D257A} теряла интенсивность сигнала почти в пять раз с 80,60 (95% CI 77,29–84,94) до 15,79 (95% CI 11,97–25,42) (рис. 8).

Исследуемые препараты дозозависимо увеличивали выживаемость клеток в условиях оксидативного стресса, вызванного добавлением H_2O_2 . При этом как видно из рисунка модифицированные пептиды (P- α B1 и P- α B3) оказывали более выраженный эффект по сравнению с базовым соединением (P- α B) при добавлении в эквивалентных дозах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пептидные агонисты гетерорецептора EPOR/CD131 являются активаторами связанных с эритропоэтином каскадов цитопротекции. Соединения P- α B1 и P- α B3 наряду с первичными антиапоптотическими свойствами обладают также антиагрегантной активностью, которая достигается за счет внесения трипептидных мотивов KGD и RGD. В данном исследовании в качестве экспериментальной модели для изучения антиатеросклеротической активности P- α B1 и P- α B3 мы использовали трансгенных мышей с митохондриальной дисфункцией на фоне тканеспецифичного нокдауна гена *Polg*, кодирующего полимеразу гамма.

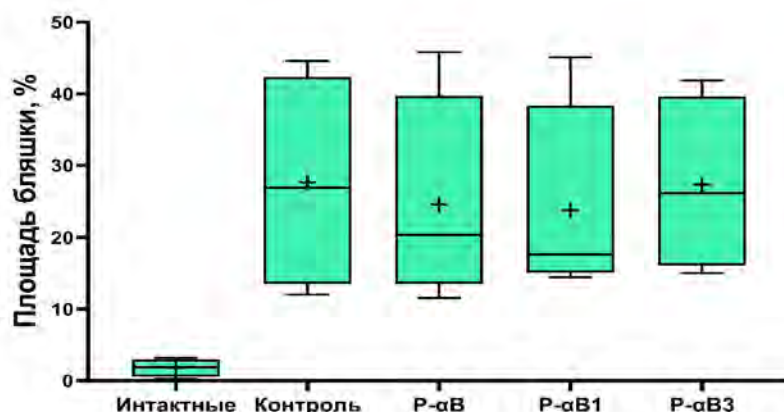


Рисунок 3 – Площадь липидных отложений

Примечание: + – среднее арифметическое.

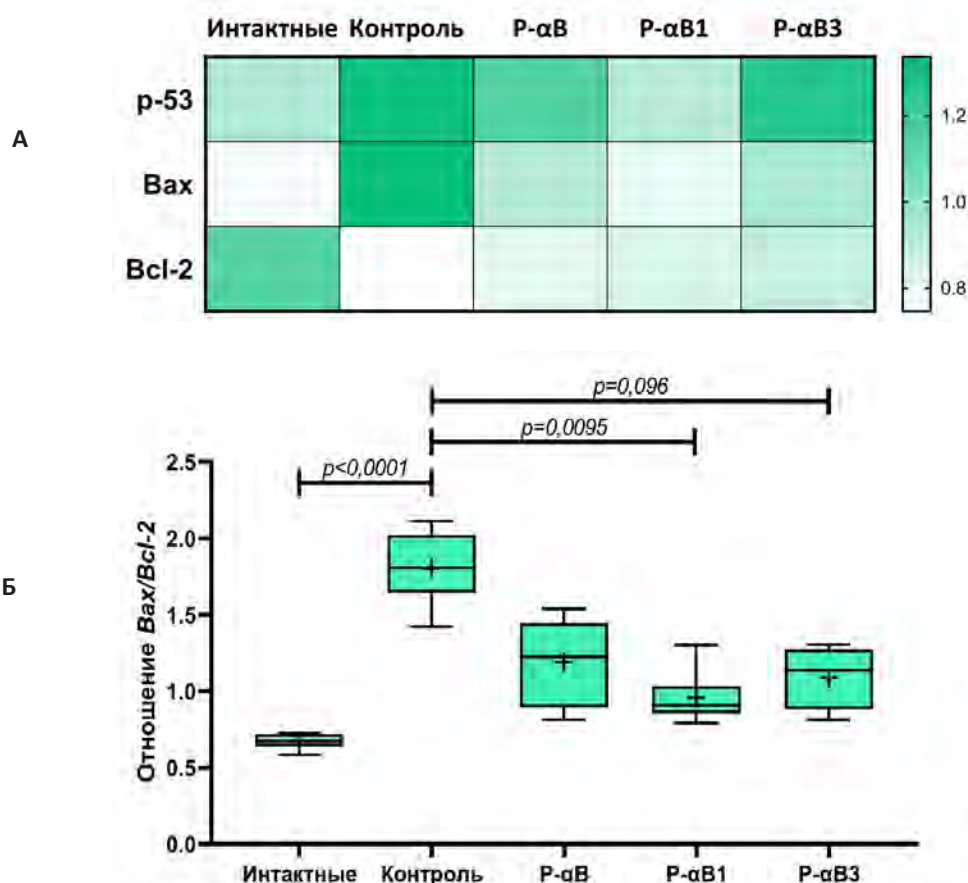


Рисунок 4 – Влияние исследуемых препаратов на относительную экспрессию маркеров апоптоза

Примечание: А) Из рисунка видно, что на фоне моделирования баллонного повреждения выражено возрастает экспрессия маркеров программируемой клеточной гибели p53 и Bax и падает экспрессия антиапоптотического маркера Bcl-2. Исследуемые препараты практически во всех случаях возвращают экспрессию p53, Bax и Bcl к уровню значений в интактной группе; Б) Рисунок Б отражает соотношение Bax/Bcl-2. Соотношение характеризует проапоптотическую направленность клетки, чем более выражена активация каскадов программируемой клеточной гибели. Из рисунка видно, что пептид P-αB1 статистически значимо снижает соотношение Bax/Bcl-2.

+ – среднее арифметическое; статистическую значимость межгрупповых отличий выявляли с применением теста Краскала-Уоллиса и пост-хок анализа по методу Данна.



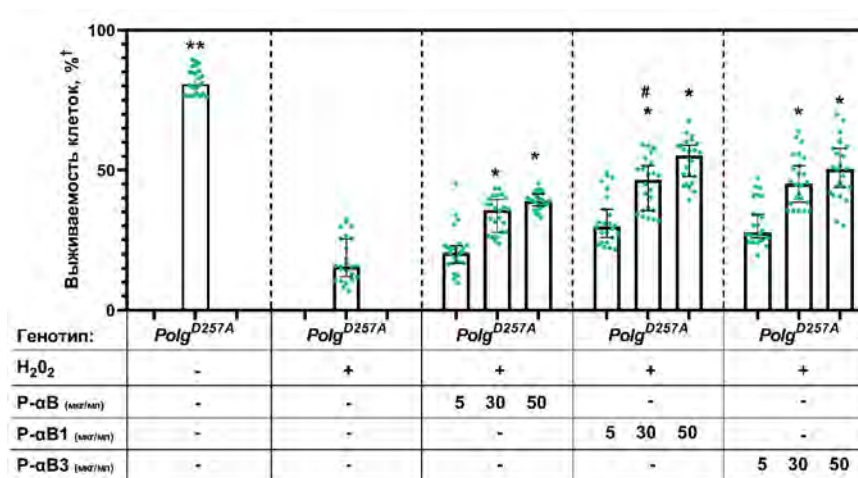
Рисунок 5 – Уровень экспрессии генов iNOS, ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина



Рисунок 6 – Уровень экспрессии VEGF-A, VEGFR, и HIF-1α



Рисунок 7 – Уровень экспрессии генов PON2, SOD2

Рисунок 8 – Влияние H₂O₂ и тестируемых пептидов на выживаемость эндотелиоцитов с генотипом Polg^{D257A}

Примечание: † – относительно интактных эндотелиоцитов дикого типа; * – $p < 0,0001$ при сравнении с группой, получавшей только H₂O₂; # – $p = 0,0783$ при сравнении с группой с добавлением P-αB 30 мкг/мл

Полимераза гамма – это фермент, который играет ключевую роль в репликации митохондриальной ДНК. Этот фермент демонстрирует высокую точность работы и, в то же время, обладает собственной 3'->5' экзонуклеазной активностью, благодаря которой возможно исправление ошибок полимеризации. Включение «неправильных» нуклеотидов без последующего исправления приводит к накоплению митохондриальных мутаций и дисфункции митохондрий [19]. В результате происходит увеличение выработки активных радикалов и повреждение клетки. Гомозиготные животные с системным нокаутом *Polg* не выживают, поэтому в нашей работе мы использовали эндотелиоспецифичный нокаут гена [20]. Данная модель отражает одно из ключевых звеньев в патогенезе атеросклероза – оксидативный стресс на фоне митохондриальной дисфункции. Тем не менее, в любой животной модели атеросклероза, индивидуальные различия в сроках и степени формирования бляшек настолько велики, что для тестирования препаратов нужны очень большие группы животных [21–23]. В этой связи мы решили стандартизировать процесс атерогенеза путем индукции атеросклероза баллонной травмой и западной диетой.

В используемой нами модели атеросклероз связан с травматическим воздействием на сосуд на фоне повреждения эндотелиоцитов вследствие дисфункции митохондрий. Для подтверждения эффектов, наблюдаемых *in vivo*, мы также провели *in vitro* изучение эффективности выбранных пептидов на первичной культуре эндотелиоцитов *Polg*^{D257A}. Для усиления оксидативного стресса мы инкубировали клетки в присутствии 200 мкМ H₂O₂.

Изучаемые пептиды продемонстрировали выраженный эндотелиопротективный эффект на модели оксидативного стресса *in vitro*. Также было обнаружено, что препараты оказывают выраженное редуцирующее влияние на экспрессию проапоптотических маркеров. Подобные результаты согласуются с представлением о базовом механизме действия производных эритропоэтина. При активации цитопротекторного гетерорецептора EPOR/CD131 происходит Jak/STAT-опосредованная передача сигнала в ядро, приводящая к сигналингу «выживания» путем снижения экспрессии проапоптотических генов [24, 25]. Аналогичные эффекты стимуляции эритропоэтиновых рецепторов прежде уже были показаны при моделировании атеросклероза [26].

Кроме того, нами было получено, что экспрессия генов антиоксидантной системы PON2 и SOD2 снизилась у леченых животных по сравнению с контролем. Мы связываем наблюдаемый эффект с тем, что в сосудах животных контрольной группы развивается сильный оксидативный и токсический стресс, который стимулирует увеличение экспрессии генов антиоксидантной системы. В то же время на фоне лечения, патологические явления в клетках были ре-

дуцированы, и стимулирующая активность в отношении генов PON2 и SOD2 также снизилась.

Также мы установили, что пептидные агонисты EPOR/CD131 обладают выраженной противовоспалительной активностью, снижая экспрессию провоспалительных цитокинов и молекул межклеточной адгезии. Воспаление является активным фактором развития атеросклероза и способствует дестабилизации атеросклеротических бляшек [27]. Особую роль в регулировании воспалительных каскадов и инфильтрации сосудов иммунными клетками играют молекулы VCAM-1 ICAM-1 IL-1b TNF-а [28–30]. В целом противовоспалительный эффект эритропоэтина и его производных являются широко изученным феноменом [31, 32]. Поэтому полученные нами данные укладываются в общее представление о фармакодинамике агонистов EPOR/CD131.

Отдельно мы решили оценить влияние исследуемых пептидов на экспрессию генов, кодирующих ангиогенные факторы. Ангиогенные факторы играют важную роль в прогрессировании атеросклероза и известно, что эритропоэтин способен стимулировать ангиогенез [33]. В зонах атеросклероза местные специфические условия (относительная аноксия, воспаление, окислительный стресс) увеличивают экспрессию классических и неклассических ангиогенных факторов, которые способствуют разрастанию ранее существовавших *vasa vasorum* [34]. Неоваскуляризация увеличивает местный поток питательных веществ и O₂ и, таким образом, может способствовать прогрессированию и ремоделированию бляшек [35]. Полученные нами результаты продемонстрировали, что в отличие от эритропоэтина, пептидные агонисты EPOR/CD131 демонстрируют антиангиогенное влияние, по крайней мере в отношении атеросклеротической бляшки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прежде нами была сформулирована и подтверждена гипотеза, что при добавлении трипептидных мотивов KGD и RGD, цитопротекторные пептидные производные эритропоэтина могут приобретать антиагрегантные свойства. В ходе данного исследования мы продемонстрировали, что два инновационных пептида и базовое соединение PαB (pHBSP) защищают эндотелиоциты *in vitro*, а также снижают проапоптотическую, провоспалительную и ангиогенную активацию клеток сосудистой стенки в модели атеросклероза в сочетании с митохондриальной дисфункцией. Подобная фармакологическая активность изучаемых препаратов представляется очень перспективной в совокупности со сведениями о наличии у них антиагрегантной активности. Таким образом наблюдаемые эффекты дополняют сведения кардиоваскулярной активности инновационных пептидов P-αB1 и P-αB3, а также новые перспективы в разработке пептидов, сочетающих в себе атеропротективные и антиагрегантные свойства.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполняется при поддержке Минобрнауки России. Соглашение о субсидии № 05.605.21.0191 (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60519X0191).

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

О.А. Пученкова – введение препаратов животным, забор органов для молекулярно-биологического и микроскопического изучения, написание статьи; **С.В. Надеждин** – выделение первичной культуры эндотелиоцитов, изучение цитопротективной активности производных эритропоэтина *in vitro*. Написание статьи; **В.О. Солдатов** – написание статьи, разработка дизайна исследования; **М.А. Жученко** – синтез пептида и анализ литературы; **Д.С. Коршунова** – выделение РНК, конвертация РНК в кДНК, анализ экспрессии таргетных генов; **М.В. Кубекина** – выделение РНК, конвертация РНК в кДНК, анализ экспрессии таргетных генов; **Е.Н. Коршунов** – хендлинг и уход за животными, подготовка экспериментальной группы животных; **Л.В. Корокина** – написание статьи, разработка дизайна исследования; **А.Л. Куликов** – провизорская служба, статистическая обработка и работа с графическим материалом; **П.А. Голубинская** – написание статьи, формализация списка литературы; **В.М. Покровский** – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов; **Е.А. Патраханов** – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов; **П.Р. Лебедев** – наблюдение и уход за животными, введение препаратов, некропия животных; **В.В. Гуреев** – написание статьи, консультации по планированию, методологии и реализации эксперимента, моделирование баллонной травмы; **Т.А. Денисюк** – статистическая обработка, написание статьи, формализация списка литературы; **В.С. Беляева** – анализ графического изображения и измерение площади атеросклеротической бляшки, выделение первичной культуры эндотелиоцитов, изучение цитопротективной активности производных эритропоэтина *in vitro*; **Е.А. Мовчан** – выделение первичной культуры эндотелиоцитов, изучение цитопротективной активности производных эритропоэтина *in vitro*, пробоподготовка образцов аорты для графического анализа; **Е.И. Лепетюха** – выделение РНК, проведение количественной ПЦР; **М.В. Покровский** – создание идеи, планирование исследования, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ, обеспечение качества.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Zárate A, Manuel-Apolinar L, Basurto L, De la Chesnaye E, Saldivar I. Cholesterol and atherosclerosis. Historical considerations and treatment. Arch Cardiol Mex. 2016; 86(2):163–9. DOI: 10.1016/j.acmx.2015.12.002.
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation; 2004; 109(23):27–32. DOI: 10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8.
- Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2009; 6(1):16–26. DOI: 10.1038/ncpcardio1397.
- Sorokin A, Kotani K, Bushueva O, Taniguchi N, Lazarenko V. The cardio-ankle vascular index and ankle-brachial index in young Russians. Journal of atherosclerosis and thrombosis. 2015; 22(2):211–8. DOI: 10.5551/jat.26104.
- Polonikov A, Bykanova M, Ponomarenko I, Sirotina S, Bocharova A, Vagaytseva K, Shvetsov Y. The contribution of CYP2C gene subfamily involved in epoxygenase pathway of arachidonic acids metabolism to hypertension susceptibility in Russian population. Clinical and Experimental Hypertension. 2017; 39(4):306–311. DOI: 10.1080/10641963.2016.1246562.
- Bennett M.R, Sinha S, Owens G.K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. Circ Res. 2016; 118(4):692–702. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.
- Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep. 2017; 19(11):42s DOI: 10.1007/s11883-017-0678-6.
- Quintero M, Colombo SL, Godfrey A, Moncada S. Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006; 103:5379–5384. DOI: 10.1073/pnas.0601026103.
- Brines M, Patel NS, Villa P, et al. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(31):10925–10930. DOI: 10.1073/pnas.0805594105.
- Korokin MV, Soldatov VO, Tietze AA, Golubev MV, Belykh AE, Kubekina MV, Puchenkova OA, Denisjuk TA, Gureyev VV, Pokrovskaya TG, Gudyrev OS, Zhuchenko MA, Zatolokina MA, Pokrovskiy MV. 11-amino acid peptide imitating the structure of erythropoietin α -helix b improves endothelial function, but stimulates thrombosis in rats. Pharmacy & Pharmacology. 2019; 7(6):312–320. Russian. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-6-312-320.
- Korokin M, Gureev V, Gudyrev O, Golubev I, Korokina L, Peresyphkina A, Pokrovskaya T, Lazareva G, Soldatov V, Zatolokina M, Pobeda A, Avdeeva E, Beskhmel'nitsyna E, Denisjuk T, Avdeeva N, Bushueva O, Pokrovskii M. Erythropoietin Mimetic Peptide (pHBSP) Corrects Endothelial Dysfunction in a Rat Model of Preeclampsia. Int. J. Mol. Sci. 2020; 21:6759. DOI: 10.3390/ijms21186759.
- Golubev IV, Gureev VV, Korokin MV, Zatolokina MA, Avdeeva EV, Gureeva AV, Rozhkov IS, Serdyuk EA, Soldatova VA. Preclinical study of innovative peptides mimicking the tertiary structure of the α -helix B of erythropoietin. Research Results in Pharmacology. 2020; 6(2):85–96. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.55385.
- Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. Nature. 2004; 429:417–423. DOI: 10.1038/nature02517.

14. Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*. 2005. 309(5733):481–484. DOI: 10.1126/science.1112125.
15. Zvartsev RV, Korshunova DS, Gorshkova EA., et al. Neonatal Lethality and Inflammatory Phenotype of the New Transgenic Mice with Overexpression of Human Interleukin-6 in Myeloid Cells. *DoklBiochemBiophys*. 2018; 483(1):344–347. DOI: 10.1134/S1607672918060157.
16. Stubbendorff M, Hua X, Deuse T, et al. Inducing myointimal hyperplasia versus atherosclerosis in mice: an introduction of two valid models. *J Vis Exp*. 2014; 87:51459. DOI: 10.3791/51459.
17. Tediashvili G, Wang D, Reichensperner H, Deuse T, Schrepfer S. Balloon-based Injury to Induce Myointimal Hyperplasia in the Mouse Abdominal Aorta. *J Vis Exp*. 2018; 132:56477. DOI: 10.3791/56477.
18. Molina-Sánchez P, Andrés V. Isolation of Mouse Primary Aortic Endothelial Cells by Selection with Specific Antibodies. *Methods in Mouse Atherosclerosis. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY. 2015; 1339. DOI: 10.1007/978-1-4939-2929-0_7.
19. Stumpf JD, Saneto RP, Copeland WC. Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial.
20. Kusov P, Deikin A. Developing Novel Transgenic Mice Model Of Atherogenesis With Conditional Oxidative Stress By Introduction Of Epithelium-Specific Inducible Mitochondrial Polg With Mutagenic Activity. *Atherosclerosis*. 2019; 287:99 s. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.287.
21. Poznyak AV, Silaeva YY, Orekhov AN, Deykin AV. Animal models of human atherosclerosis: current progress. *Braz J Med Biol Res*. 2020. 53(6):9557 s. DOI: 10.1590/1414-431x20209557.
22. Mushenkova NV, Summerhill VI, Silaeva YY, Deykin AV, Orekhov AN. Modelling of atherosclerosis in genetically modified animals. *Am J Transl Res*. 2019.11(8):4614–4633.
23. Volobueva AS, Orekhov AN, Deykin AV. An update on the tools for creating transgenic animal models of human diseases – focus on atherosclerosis. *Braz J Med Biol Res*. 2019; 52(5):8108. DOI: 10.1590/1414-431X20198108.
24. Bittorf T, Jaster R, Lüttke B, Kamper B, Brock J. Requirement for JAK2 in erythropoietin-induced signalling pathways. *Cell Signal*. 1997; 9(1):85–89. DOI: 10.1016/S0898-6568(96)00121-0.
25. Peng B, Kong G, Yang C. et al. Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation. *Cell Death Dis*. 2020; 11(79). DOI: 10.1038/s41419-020-2276-8.
26. Warren JS, Zhao Y, Yung R, Desai A. Recombinant human erythropoietin suppresses endothelial cell apoptosis and reduces the ratio of Bax to Bcl-2 proteins in the aortas of apolipoprotein E-deficient mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2011; 57(4):424–433. DOI: 10.1097/fjc.0b013e31820d92fd.
27. Bäck M, Yurdagul A, Tabas I. et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol*. 2019; 16:389–406. DOI: 10.1038/s41569-019-0169-2.
28. Ley K, Huo Y. VCAM-1 is critical in atherosclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 107(10):1209–1210. DOI: 10.1172/JCI13005.
29. Fatkhullina AR, Peshkova IO, Koltsova EK. The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis. *Biochemistry (Mosc)*. 2016; 81(11):1358–1370. DOI: 10.1134/S0006297916110134.
30. Fotis L, Agogiannis G, Vlachos IS, Pantopoulou A, Margoni A, Kostaki M, Verikokos C, Tzivras D, Mikhailidis DP, Perrea D. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model. *In Vivo*. 2012; 26:243–250.
31. Nairz M, Sonnweber T, Schroll A, Theurl I, Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation. *Microbes Infect*. 2012; 14(3):238–246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005.
32. Liu Y, Luo B, Shi R, et al. Nonerythropoietic Erythropoietin-Derived Peptide Suppresses Adipogenesis, Inflammation, Obesity and Insulin Resistance. *Sci Rep*. 2015:515134. DOI: 10.1038/srep15134.
33. Kimáková P, Solár P, Solárová Z, Komel R, Debeljak N. Erythropoietin and Its Angiogenic Activity *Int J Mol Sci*. 2017; 18(7):1519. DOI: 10.3390/ijms18071519.
34. Michel JB, Martin-Ventura JL, Nicoletti A, Ho-Tin-Noe B. Pathology of human plaque vulnerability: mechanisms and consequences of intraplaquehaemorrhages. *Atherosclerosis*. 2014; 234(2) 311–319.
35. Camaré C, Pucelle M, Nègre-Salvayre A, Salvayre R. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biol*. 2017; 12:18–34. DOI: 10.1016/j.redox.2017.01.007.

АВТОРЫ

Олеся А. Пученкова – студентка 6 курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-7657-0937. E-mail: lesya759@yandex.ru

Сергей В. Надеждин – кандидат биологических наук, научный сотрудник НИИ Фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-6249-2464. E-mail: sergey_nadezhdin@yahoo.com

Владислав О. Солдатов – младший научный сотрудник, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCIDID: 0000-0001-9706-0699. E-mail: pharmsoldatov@gmail.com

Максим А. Жученко – кандидат биологических наук, начальник сектора, НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика. E-mail: maksim.zhuchenko@pharmapark.ru

Диана С. Коршунова – младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии гена РАН». ORCID ID: 0000-0002-0259-7045 E-mail: korshunova@genebiology.ru

Марина В. Кубекина – аспирант, младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт биологии гена РАН». ORCID ID: 0000-0002-8834-1111. E-mail: marykumy@gmail.com

Евгений Н. Коршунов – заведующий виварием, младший научный сотрудник ФГБУН «Института биологии гена РАН». ORCID ID: 0000-0001-8170-4656. E-mail: korshunov@genebiology.ru

Лилия В. Корокина – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0001-5402-0697. E-mail: korokina@mail.ru

Александр Л. Куликов – научный сотрудник научный сотрудник НИИ Фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: E-mail: alex-3031@yandex.ru

Полина А. Голубинская – заведующая клинико-диагностической лабораторией, Бюджетное учреждение здравоохранения Воронежской области «Воронежская областная клиническая офтальмологическая больница» (БУЗ ВО «ВОКОБ»). ORCID ID: 0000-0002-1765-9042. E-mail: polinapigeon@gmail.com

Владимир М. Покровский – студент 5 курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0003-3138-2075. E-mail: vmpokrovsky@yandex.ru

Евгений А. Патраханов – студент 5 курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). Наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов. ORCID ID: 0000-0002-8415-4562. E-mail: pateval7@gmail.com

Петр Р. Лебедев – студент 5 курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0001-9102-3360. E-mail: Artkeit@yandex.ru

Владимир В. Гуреев – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0003-1433-1225. E-mail: produmen@yandex.ru

Татьяна А. Денисюк – доктор медицинских наук, доцент кафедры фармакологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-0974-4818. E-mail: denitatyana@yandex.ru

Вероника С. Беляева – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0003-2941-0241. E-mail: nika.believa@yandex.ru

Евгения А. Мовчан – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-6244-2563. E-mail: ms.movchan@mail.ru

Елизавета И. Лепетюха – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). E-mail: lisitsa007@bk.ru

Михаил В. Покровский – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, руководитель НИИ Фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID: 0000-0002-2761-6249. E-mail: mpokrovsky@yandex.ru

УДК 547.814.5:544.18



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ АНТИРАДИКАЛЬНОЙ (НО·) АКТИВНОСТИ РОДСТВЕННЫХ СТРУКТУР, СОДЕРЖАЩИХ ЦИННАМОИЛЬНЫЙ ФРАГМЕНТ. II. ПРОИЗВОДНЫЕ 2',4'-ДИГИДРОКСИХАЛКОНА, А ТАКЖЕ ФЛАВАНОНА И ФЛАВОНА, СОДЕРЖАЩИЕ ГИДРОКСИГРУППУ В ПОЛОЖЕНИИ 7

Э.Т. Оганесян, С.С. Шатохин

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

E-mail: edwardov@mail.ru

Получено 30.11.2019

Рецензия (1) 12.02.2020

Рецензия (2) 15.04.2020

Принята к печати 12.05.2020

Изучено 42 производных 2',4'-дигидроксиалкона, флаванона и флавонола, содержащих гидроксигруппу в положении 7 (кольцо «А»), а также заместители в кольце «В».

Цель работы: изучение квантово-химических параметров производных 2',4'-дигидроксиалкона, флаванона и флавонола, содержащих гидроксигруппу в положении 7, с целью выявления влияния заместителей в ароматическом ядре «А» на маллиkenовские заряды (a.e), связевые числа (N_ц), индекс ненасыщенности (IUA) и электронную плотность атомов углерода циннамоильного фрагмента.

Материалы и методы. Полуэмпирическим методом PM7 (программа WinMopas 2016) на рабочей станции с процессором IntelXeonE5-1620 3,5 ГГц, 20 Гб оперативной памяти рассчитаны перечисленные выше квантово-химические параметры анализируемых соединений.

Результаты и их обсуждение. Анализ величин квантово-химических параметров, а также их сравнение с соответствующими показателями, представленными в нашем сообщении I, позволил выявить ряд важных особенностей, связанных с влиянием гидроксигруппы в положении 7 (кольцо «А») на изучаемые параметры молекул. Установлено, что гидроксигруппа в кольце «А» не оказывает существенного влияния на маллиkenовский заряд и электронную плотность атомов углерода пропенонового звена C-7→C-8→C-9. На атоме C-9 (карбонильный углерод) маллиkenовский заряд всегда имеет положительное значение, а электронная плотность равна примерно 3,4670–3,4840 у всех трех групп соединений. Переход от 2',4'-дигидроксиалкона к флаванону и флавонолу путем формирования пиранового гетероцикла сопровождается повышением отрицательного заряда на C-8, что можно объяснить вовлечением гетероатома кислорода в процесс передачи электронных эффектов. Гидроксигруппа в кольце «А» практически не влияет на заряд и электронную плотность атомов. Анализ значений связевых чисел и индексов ненасыщенности свидетельствует о том, что наименьшим значением N_ц характеризуются атомы C-1 производных 2',4'-дигидроксиалкона и 7-гидроксиалкона; наименьшие связевые числа характерны для атома C-8 производных 7-гидроксиалкона. Из этого следует, что первичная атака электрофильного по характеру радикала НО· будет направлена на C-1 (у халконов и флаванонов) и C-8 у флавонолов.

Заключение. Проведенные расчеты позволяют проанализировать влияние гидроксигруппы в кольце «А» на важнейшие квантово-химические параметры молекул, что может быть полезно при прогнозировании биологической активности флавоноидных соединений за счет их антирадикального влияния на активные формы кислорода (АФК).

Ключевые слова: гидроксильный радикал, халконы, флаваноны, флавоны, маллиkenовские заряды, связевые числа, индекс ненасыщенности, электронная плотность

Для цитирования: Э.Т. Оганесян, С.С. Шатохин. Использование квантово-химических параметров для прогнозирования антирадикальной (но·) активности родственных структур, содержащих циннамоильный фрагмент. II. Производные 2',4'-дигидроксиалкона, а также флаванона и флавонола, содержащих гидроксигруппу в положении 7. *Фармация и фармакология*. 2020;8(2): 112-123. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-112-123

© Э.Т. Оганесян, С.С. Шатохин, 2020

For citation: E.T. Oganessian, S.S. Shatokhin. Using quantum-chemical parameters for predicting anti-radical (no·) activity of related structures containing a cinnamoyl fragment. II. Derivatives of 2',4'-dihydroxychalcone, flavanone and flavone, containing a hydroxy group in position 7. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(2):112-123. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-112-123

USING QUANTUM-CHEMICAL PARAMETERS FOR PREDICTING ANTI-RADICAL (HO·) ACTIVITY OF RELATED STRUCTURES CONTAINING A CINNAMOYL FRAGMENT

II. DERIVATIVES OF 2',4'-DIHYDROXYCHALCONE, FLAVANONE AND FLAVONE, CONTAINING A HYDROXY GROUP IN POSITION 7

E.T. Oganesyan, S.S. Shatokhin

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

E-mail: edwardov@mail.ru

Received 30 November 2019

Review (1) 12 February 2020

Review (2) 15 April 2020

Accepted 12 May 2020

42 derivatives of 2',4'-dihydroxychalcone, flavanone and flavone, containing the hydroxy group in position 7 (ring "A"), as well as substituents in the ring "B", have been studied.

The aim is to study the quantum-chemical parameters of 2',4'-dihydroxychalcone, flavanone and flavone derivatives containing a hydroxy group in position 7, in order to identify the effect of substituents on Mulliken charges (a.e) in the aromatic core "A", bond numbers (N_{μ}), the unsaturation index (IUA) and the electron density of the carbon atoms of the cinnamoyl fragment.

Materials and methods. The listed above parameters have been calculated by the semi-empirical method PM7 (WinMopac 2016 program) on the workstation with an Intel Xeon E5-1620 3.5 GHz processor, 20 GB of RAM.

Results and discussion. The analysis of the values of quantum-chemical parameters, as well as their comparison with the corresponding indicators presented in Report I, revealed a number of important features associated with the influence of the hydroxy group in position 7 (ring "A") on the studied quantum-chemical parameters of molecules. It has been established that the hydroxy group in the ring "A" does not significantly affect the Mulliken charge and the electron density of the carbon atoms of the propenone unit C-7→C-8→C-9. On atom C-9 (carbonyl carbon), the Mulliken charge always has a positive value, and the electron density is about 3.4670-3.4840 for all three groups of compounds. The transition from 2',4'-dihydroxychalcone to flavanone and flavone by the formation of the pyrone heterocycle, is accompanied by an increase in the negative charge on C-8, which can be explained by the involvement of the oxygen heteroatom in the transmission of electronic effects. The hydroxy group in the ring "A", has practically no effect on the charge and electron density of atoms. An analysis of the values of bond numbers and unsaturation indices suggests that atoms C-1 of 2',4'-dihydroxychalcone and 7-hydroxyflavanone derivatives, are characterized by the lowest N_{μ} value; the lowest bond numbers are characteristic for atom C-8 derivatives of 7-hydroxyflavone. Consequently, the primary attack of the HO· radical will be directed at C-1 (in chalcones and flavanones) and at C-8 in flavones.

Conclusion. The performed quantum-chemical calculations make it possible to analyze the effect on the main quantum-chemical parameters of the molecule, which can be useful in predicting the biological activity of flavanoid compounds due to their antiradical effect on reactive oxygen intermediate species (ROIs).

Keywords: hydroxyl radical, chalcones, flavanones, flavones, Mulliken charges, bond numbers, unsaturation index, electron density

ВВЕДЕНИЕ

Известные факты о взаимосвязи процессов свободнорадикального окисления с формированием патохимических процессов и возникающими при этом заболеваниями актуализирует проблему дальнейшего поиска новых производных флавоноидных соединений, проявляющих антирадикальные свойства [1–3]. В этой связи значительный интерес представляют структуры, содержащие три заместителя в положениях 2,3,4 ароматического ядра главной цепи сопряжения [4] (циннамоильный фрагмент): 2,3,4-тригидрокси-, 2,4-диметокси-3-гидрокси- и 2,4-дитретбутил-3-гидроксипроизводные

[5]. При таком типе замещения фенольный гидроксил у C-3 находится в окружении двух орто-заместителей, благодаря экранирующему эффекту которых образующийся пространственно затрудненный феноксильный радикал характеризуется достаточной устойчивостью. Важно отметить, что свободная энергия Гиббса гомолитического разрыва связи Н-О достаточно низкая и составляет в среднем –163,61 кДж/моль. Моделирование молекулярной динамики изменения потенциальной энергии связи Н-О позволило определить энергию активации, равной 34.918 кДж/моль, а это говорит о легком протекании этой реакции при температурах ~36–37°C (~310 К).

В продолжение наших исследований нами изучено 42 соединения – производных халкона, флаванона и флавола, содержащих заместители в кольце «В» и гидроксильную группу в положении 7 кольца «А».

ЦЕЛЬ РАБОТЫ – изучение квантово-химических параметров производных 2',4'-дигидроксиалкона, флаванона и флавола, содержащих гидроксигруппу в положении 7, с целью выявления влияния заместителей в ароматическом ядре «А» на маллиkenовские заряды (а.е), связевые числа (N_μ), индекс ненасыщенности (IUA) и электронную плотность атомов углерода циннамоильного фрагмента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Квантово-химические параметры анализируемых структур рассчитывались на рабочей станции с процессором Intel Xeon E5-1620 3,5 ГГц, 20 Гб оперативной памяти.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе нами проанализированы

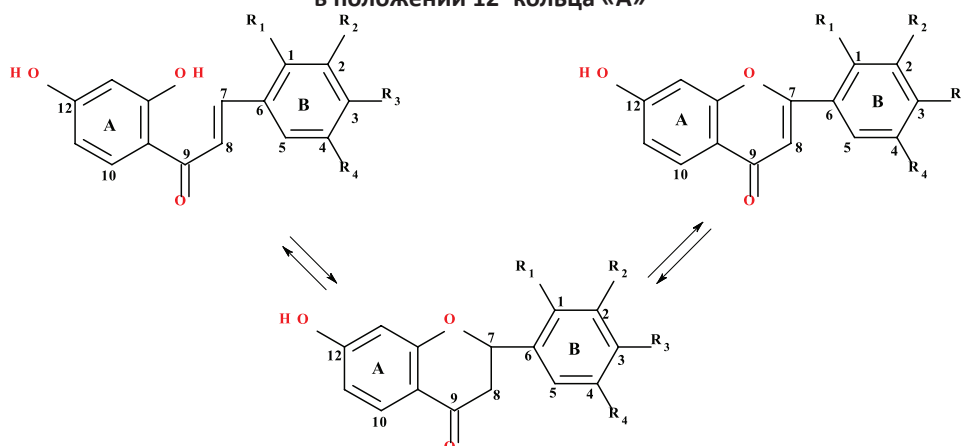
квантово-химические параметры соединений, структуры и условные обозначения которых представлены в таблице 1.

Маллиkenовские заряды (а.е)

В нашем предыдущем сообщении [5] помимо коричной кислоты анализу были подвергнуты производные 2'-гидроксиалкона, не содержащие заместителей в кольце «А», и соответствующие им флаваноны.

У 2'-гидроксиалкона и соответствующего ему флаванона [4] на атоме С-9 положительный маллиkenовский заряд соответственно равен примерно +0,4657 и +0,5222, а на атоме С-8 у всех проанализированных соединений без исключения он имеет отрицательное значение, равное, примерно, -0,300. Это дало нам основание сделать вывод о том, что первичная атака радикала HO· происходит именно по положению С-8 как коричной кислоты, так и 2'-гидроксиалкона, а также соответствующего флаванона [5, 6].

Таблица 1 – Производные халкона, флаванона и флавола, содержащие гидроксигруппу в положении 12* кольца «А»**

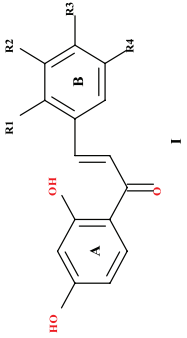
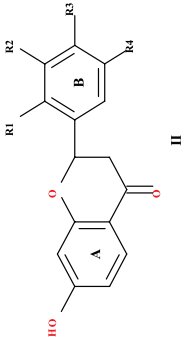
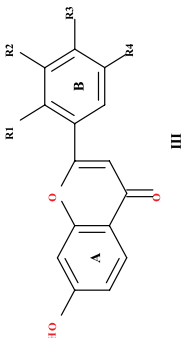


Соединения, № п/п			Положение заместителей в кольце «В»			
халкон	флаванон	флавола	1	2	3	4
1х	1анон	1он	H	H	H	H
2х	2анон	2он	ОН	H	H	H
3х	3анон	3он	CH ₃ O	H	H	H
4х	4анон	4он	H	ОН	H	H
5х	5анон	5он	H	CH ₃ O	H	H
6х	6анон	6он	H	H	ОН	H
7х	7анон	7он	H	H	CH ₃ O	H
8х	8анон	8он	H	ОН	ОН	НН
9х	9анон	9он	H	CH ₃ O	ОН	H
10х	10анон	10он	H	ОН	CH ₃ O	H
11х	11анон	11он	H	CH ₃ O	CH ₃ O	H
12х	12анон	12он	H	ОН	ОН	ОН
13х	13анон	13он	H	CH ₃ O	CH ₃ O	CH ₃ O
14х	14анон	14он	H	(CH ₃) ₃ C	ОН	(CH ₃) ₃ C

* Нумерация углеродных атомов приведена в соответствии с таковой, генерируемой расчетными программами

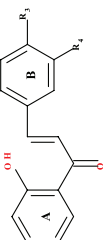
** Схема представлена в соответствии с [6]

Таблица 2 – Значения маллиеновских зарядов (а.е.) на атоме С-8 циннамоильного фрагмента производных 2',4'-дигидроксифлаванона (I), 7-гидроксифлаванона (II), 7-гидроксифлаванона (III), содержащих одинаковые заместители в кольце «В»

Структуры анализируемых соединений		
№ п/п*	Положение заместителей в кольце «В»	
		
		
1	$R_1=R_2=R_3=R_4=H$	а.е. -0,3194
2	$R_1=OH, R_2=R_3=R_4=H$	а.е. -0,3647
3	$R_1=OCH_3, R_2=R_3=R_4=H$	а.е. -0,3674
4	$R_2=OH, R_1=R_3=R_4=H$	а.е. -0,2996
5	$R_2=OCH_3, R_1=R_3=R_4=H$	а.е. -0,3037
6	$R_3=OH, R_1=R_2=R_4=H$	а.е. -0,3373
7	$R_3=OCH_3, R_1=R_2=R_4=H$	а.е. -0,3427
8	$R_2=R_3=OH, R_1=R_4=H$	а.е. -0,3243
9	$R_2=OCH_3, R_3=OH, R_1=R_4=H$	а.е. -0,3288
10	$R_2=OH, R_3=OCH_3, R_1=R_4=H$	а.е. -0,3276
11	$R_2=R_3=OCH_3, R_1=R_4=H$	а.е. -0,3329
12	$R_2=R_3=OH, R_1=R_4=H$	а.е. -0,3016
13	$R_2=R_3=R_4=OCH_3, R_1=H$	а.е. -0,3190
14	$R_2=R_4=(CH_3)_3C, R_3=OH, R_1=H$	а.е. -0,3467

* Нумерация соединений дается в соответствии с таблицей 1

Таблица 3 – Электронная плотность на атоме С-8 циннамоильного фрагмента производных 2'-гидроксиалкона (I), флаванона (II), флаванона (III), 2',4'-дигидроксиалкона (IV), 7-гидроксиалкона (V), 7-гидроксиалкона (VI), содержащих одинаковые заместители в кольце «В»

Структуры анализируемых соединений							
№ п/п		II	III	IV	V	VI	
1	R ₁ =R ₂ =R ₃ =R ₄ =H	4,4195	4,4400	4,4320	4,3190	4,4406	4,4249
2	R ₁ =OH, R ₂ =R ₃ =R ₄ =H	4,3648	4,4468	4,4326	4,3640	4,4487	4,4266
3	R ₁ =OCH ₃ , R ₂ =R ₃ =R ₄ =H	4,3681	4,4394	4,4412	4,3675	4,4416	4,4343
4	R ₂ =OH, R ₁ =R ₃ =R ₄ =H	4,2997	4,4374	4,4186	4,2994	4,4359	4,4113
5	R ₂ =OCH ₃ , R ₁ =R ₃ =R ₄ =H	4,3037	4,4365	4,4214	4,3033	4,4355	4,4142
6	R ₃ =OH, R ₁ =R ₂ =R ₄ =H	4,3373	4,4413	4,4491	4,3370	4,4425	4,4423
7	R ₃ =OCH ₃ , R ₁ =R ₂ =R ₄ =H	4,3428	4,4406	4,4532	4,3425	4,4414	4,4466
8	R ₂ =R ₃ =OH, R ₁ =R ₄ =H	4,3244	4,4373	4,4347	4,3239	4,4397	4,4282
9	R ₂ =OCH ₃ , R ₃ =OH, R ₁ =R ₄ =H	4,3288	4,4357	4,4373	4,3284	4,4371	4,4304
10	R ₂ =OH, R ₃ =OCH ₃ , R ₁ =R ₄ =H	4,3277	4,4383	4,4386	4,3275	4,4387	4,4316
11	R ₂ =R ₃ =OCH ₃ , R ₁ =R ₄ =H	4,3329	4,4376	4,4412	4,3327	4,4382	4,4342
12	R ₂ =R ₃ =R ₄ =OH, R ₁ =H	4,3017	4,4337	4,4233	4,3013	4,4343	4,4158
13	R ₂ =R ₃ =R ₄ =OCH ₃ , R ₁ =H	4,3136	4,4370	4,4355	4,3130	4,4378	4,4495
14	R ₂ =R ₄ =(CH ₃) ₃ C, R ₃ =OH, R ₁ =H	4,3468	4,4401	4,4558	4,3455	4,4380	4,4179

В настоящем сообщении рассматриваются производные 2',4'-дигидроксиалкона, которые при гетероциклизации переходят соответственно в 7 (12)-гидроксифлаваноны.*

Переход 2',4'-дигидроксиалкона в соответствующий 7-гидроксифлаванон и далее в 7-гидроксифлаванон вызывает изменения в значениях маллиkenовских зарядов на атомах C-1 – C-8. В отсутствие заместителей в кольце «В» у всех трех типов структур на атомах C-1 – C-6 и C-8 маллиkenовский заряд имеет отрицательное значение. При наличии заместителя (ОН или ОСН₃) в положениях C-1 и/или C-3 кольца «В» (соединения 2х – 7х; 2анон – 7анон; 2он – 7он) на атоме C-8 отрицательный маллиkenовский заряд существенно возрастает, достигая максимума -0,4420 (в среднем) у флаванона (соединения 2анон, 3анон, 6анон, 7анон) и -0,4374 (в среднем) у флавола (соединения 2он, 3он, 6он, 7он). У соответствующих халконов маллиkenовский заряд на C-8 составляет в среднем -0,3527 (соединения 2х, 3х, 6х, 7х). На атомах C-1 (соединения 2х, 3х, 2анон, 3анон, 2он, 3он) заряд положительный и равен в среднем +0,3244 (соединения 2х и 3х), +0,2700 (соединения 2анон и 3анон) и +0,3191 (соединения 2он, 3он). Аналогичная картина наблюдается и для соединений 4х, 5х, 4анон, 5анон, 8анон – 13анон, 5он – 12он и 14он. На атомах C-3 (соединения 6х – 14х, 6анон – 13анон, 8он – 12он) и практически на всех атомах C-7 (за исключением соединений 4х, 8х – 10х, 12х, 13х) заряд также имеет положительное значение.

Изменения величин маллиkenовских зарядов на C-8 у производных халкона (соединения 1х – 14х), флаванона (соединения 1анон – 14анон) и флавола (соединения 1он – 14он) подчиняются одной и той же закономерности: у соединений, содержащих гидроксид- и метоксигруппы в положении C-1 кольца «В» (*орто*-положение к главной цепи сопряжения) величина заряда равна в среднем -0,3657 (соединения 2х, 3х), -0,4450 (соединения 2анон, 3анон) и -0,4304 (соединения 2он, 3он) (табл. 2).

На атомах углерода, с которыми связаны электронодонорные ОН и ОСН₃-группы, маллиkenовский заряд имеет положительное значение +0,3406 (соединения 2х), +0,2845 (соединения 6анон) и +0,3476 (соединения 2он).

Аналогичная картина наблюдается и в том случае, если ОН и ОСН₃-группы расположены в положении C-3 кольца «В» (*пара*-положение к главной цепи сопряжения): у халконов 6х и 7х маллиkenовский заряд на C-8 соответственно равен -0,3370 и -0,3425, у флаванонов 6анон и 7анон -0,4424 и -0,4414, у флавонов 6он и 7он -0,4423 и -0,4466 соответственно. Производные халкона 8х – 11х, флаванона 8анон – 11анон и флавола 8он

– 11он в положениях 2 и 3 кольца «В» одновременно содержат по два заместителя: 2,3-дигидроксид, 2-метокси-3-гидроксид, 2-гидроксид-3-метоксид и 2,3-диметоксид. У перечисленных соединений маллиkenовский заряд на C-8 изменяется незначительно: у халконов 8х – 11хон в среднем равен -0,3281, у флаванонов 8анон – 11анон он составляет в среднем -0,4385, у флавонов 8он – 11он а.е. -0,4310.

Маллиkenовский заряд на C-8 у соединений 6х, 7х (халконы), 6анон, 7анон (флаваноны), 6он, 7он (флавоны), содержащих один заместитель (ОН или ОСН₃) в положении 3 кольца «В», значительно выше, чем у соединений 8х – 11х (халконы), 8анон – 11анон (флаваноны) и 8он – 11он (флавоны), которые в положениях 2,3 содержат ОН и ОСН₃ группы. Понятно, что при наличии одного заместителя у C-3 полярное сопряжение с пропеноновым фрагментом гораздо выше, чем с двумя заместителями в положениях C-2 и C-3 одновременно. Данный факт объясняется конкурирующим вкладом заместителя у C-2 с таковым у C-3, что видно при сравнении вклада σ констант Тафта: ОН мета +0,127; ОН пара -0,370; ОСН₃ мета +0,115; ОСН₃ пара -0,268 [7, 8].

Соединения 13х, 14х, 13анон, 14анон, 13он, 14он содержат по три заместителя в положениях 2, 3, 4 и, несмотря на конкурентный вклад σ констант Тафта, характеризуются примерно одинаковыми величинами маллиkenовского заряда на C-8.

Следует отметить, что на карбонильном углероде C-9 маллиkenовский заряд характеризуется высоким положительным значением для всех анализируемых соединений и находится в пределах от 0,5200 до 0,5335. На основании данных таблицы 2 можно постулировать следующее:

1. значения маллиkenовских зарядов на C-8 циннамойльного фрагмента у халконов попарно (соединения I и IV) практически одинаковые (различия по четвертому знаку после запятой), из чего следует, что ОН-группа в положении 4' (соединения IV) практически не оказывает влияния на заряд атома C-8;
2. у производных 2',4'-дигидроксиалконов (соединения 1х, 4х, 5х, 10х, 12х, 13х) на атоме C-7 наблюдается очень незначительный отрицательный заряд (в среднем -0,0180); здесь электронодонорные заместители ОН и ОСН₃ находятся в положениях C-1 или C-3 кольца «В»;
3. гетероциклизация халконов до соответствующих флаванонов и флавонов способствует повышению отрицательного заряда на C-8, что связано с вовлечением гетероатома кислорода в процесс передачи электронных эффектов;
4. отрицательный заряд на C-8 у флаванонов (структуры II и IV) значительно выше, чем у соответствующих флавонов (структуры III и VI): у флаванонов отсутствует виниленовая группа C-7 – C-8;
5. если сравнить положительный заряд на атомах

* По общепринятой для флавоноидов номенклатуре рассматриваемые структуры должны обозначаться как 7-гидроксифлаваноны и 7-гидроксифлавоны. В скобках цифра 12 означает положение, которое генерирует расчетная программа.

С-7 анализируемых соединений, то легко заметить, что этот заряд у флаванонов практически в 2 раза ниже, чем у флавонов.

6. перечисленные особенности распределения малликеновских зарядов свидетельствуют о том, что электрофильный гидроксильный радикал в первую очередь присоединится по положению С-8.

Электронная плотность

Обсуждая химические свойства органических соединений, содержащих фрагменты с сопряженными связями, полезными оказываются не только зарядовое распределение на реакционных участках, но и электронная плотность на атомах углерода.

Анализируя полученные нами данные о величинах электронной плотности на атомах углерода циннамоильного фрагмента, можно понять, что, используя зависимость между малликеновским зарядом (q_{μ}) данного атома, его электронной плотностью (P_{μ}) и числом электронов, вносимых этим атомом в общую π -систему (n_{μ}), можно определить любой из этих параметров, используя выражение [9–11]:

$$q_{\mu} = n_{\mu} - P_{\mu}$$

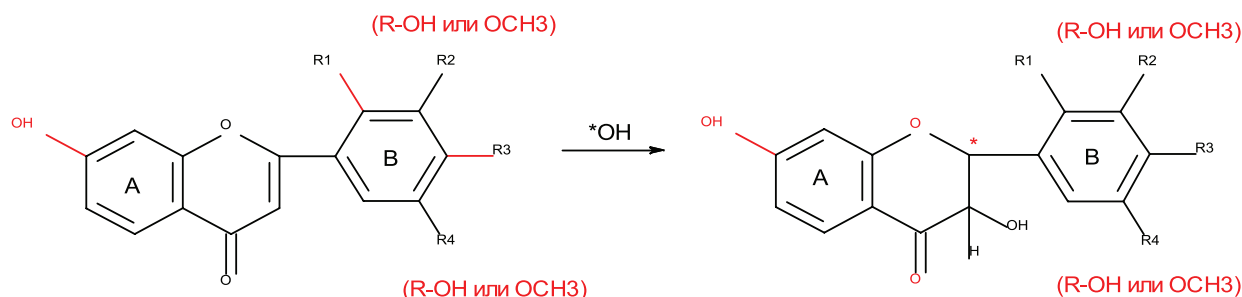
Сопоставляя данные таблиц 2, 3 и 4, а также таковые, приведенные в сообщении I, нами установлено, что все атомы пропенонового звена С-7–С-8–С-9 для формирования π -системы приносят 4 электрона. Отметим, что величина электронной плотности для всех соединений равна 4 – (а.е.), в чем легко убедиться из данных таблицы 3. Например, если а.е. = –0,26842, то эл. плотность = 4 – (–0,26842) = 4,2684; если же а.е. = +0,34766, то эл. плотность = 4 – 0,34766 = 3,6523. У всех анализируемых групп соединений (в том числе представленных в сообщении I) наиболь-

шая электронная плотность в системе связей кольцо «В»→С-7→С-8→С-9 сосредоточена на С-8.

Анализируя значения электронных плотностей на С-8 соединений, рассматриваемых в данной статье, и ранее приведенных в нашем сообщении I, можно заметить, что наличие гидроксигруппы в кольце «А» (положение 4' у халконов и 7 у флаванонов и флавонов) практически не влияет на величину данного параметра. Для сравнения в таблице 4 представлены значения электронных плотностей на С-8 соединений, содержащих электронодонорные заместители в положении 1-4 кольца «В».*

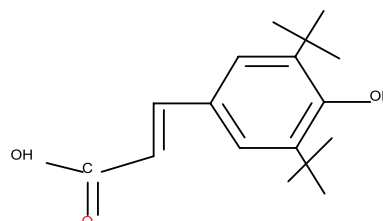
Из данных таблицы 3 следует, что значения электронных плотностей на С-8 у 2'-гидрокси- и 2',4'-дигидроксихалконов практически одинаковые, что наблюдалось и с малликеновскими зарядами (табл. 2). Такая же зависимость отмечается как для производных флаванона, не содержащих гидроксигруппу в кольце «А», так и 7-гидроксифлаванонов; у этих соединений отсутствует виниленовая группа С-7→С-8. Отсутствие последней формально исключает влияние +М-эффекта со стороны электронодонорных заместителей кольца «В» по цепи углеродных атомов С-6→С-7→С-8, однако, учитывая наличие гетероатома кислорода, можно предположить его участие в передаче электронных эффектов по цепи С-6→С-7→О→кольцо «А». Такое допущение справедливо, поскольку электронные плотности на С-8 у флаванонов и флавонов очень близки (табл. 3).

Таким образом, учитывая электрофильные свойства гидроксильного радикала, а также величины малликеновских зарядов и электронных плотностей, можно с высокой долей вероятности утверждать, что присоединение радикала ·ОН, возможно в первую очередь по положению С-8, что можно представить в виде схемы:



Данная схема согласуется с выводами в работе [13, 14], полученными на основе расчетов энтальпий образования радикальных аддуктов.

Ранее нами, в соответствии с прогнозом, было получено производное коричной кислоты, которое в арильном остатке главной цепи сопряжения (кольцо «В») содержало трет-бутильные радикалы в положениях С-2 и С-4 и гидроксигруппу у С-3 [12]. Оно проявило высокую церебропротекторную, антиоксидантную, эндотелиопротекторную и актопротекторную активности [15–18]:



4-гидрокси-3,5-ди-трет-бутил коричная кислота

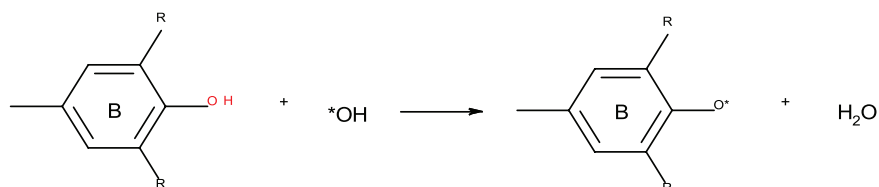
* С целью сравнения в таблицу 3 включены значения электронных плотностей для 2'-ОН-халкона и незамещенного по кольцу «А» флаванона.

Данное производное коричной кислоты по антиоксидантной активности достоверно превосходит аскорбиновую кислоту в 2,8 раза, рутин – в 5 раз, кверцетин – в 6 раз, дигидрокверцетин – в 4,6 раза [12].

Столь высокую активность можно объяснить как наличием стерически затрудненной гидроксигруппы у С-3, так и высокой электронной плотностью

(–4,3252) на С-8. Энергия Гиббса гомолитического расщепления связи О–Н по нашим уточненным данным составляет 181,29 кДж/моль.

Методом молекулярной динамики нами была смоделирована реакция, согласно которой реализуется процесс, приводящий к формированию высокоактивного и пространственно затрудненного фенокисильного радикала:



Становится очевидным и неоспоримым тот факт, что циннамоильный фрагмент в качестве главной цепи сопряжения привносит наибольший вклад в реакционную способность по отношению к активным формам кислорода (АФК) и, следовательно, в фармакологическую активность. Данный вывод подтверждает ранее изложенные результаты [13, 14].

Перечисленные выше выводы явились обоснованием для прогнозирования производных халкона, флаванона и флавона, содержащих в арильном остатке «В» двух трет-бутильных радикалов в положениях 2,4 и гидроксигруппы при С-3 (табл. 1). Эти соединения являются пока виртуальными и со временем будут синтезированы, однако мы сочли необходимым

проанализировать их квантово-химические характеристики, которые приведены в таблицах 2–4.

В предыдущем сообщении мы указывали, что от величины индекса ненасыщенности (IUA) атома углерода, с которым связана гидроксигруппа зависит энергия Гиббса гомолитического разрыва связи Н–О: чем больше значение IUA, тем ниже энергия разрыва связи.

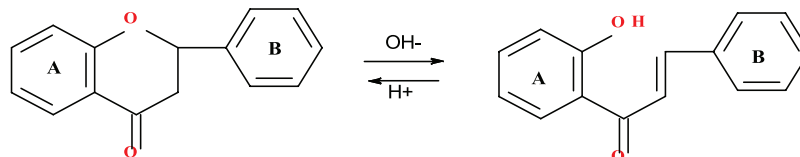
Учитывая близость квантово-химических характеристик прогнозируемых структур -14халкон, 14флаванон и 14флафон (табл. 1) с таковыми ранее полученного производного коричной кислоты, можно говорить об их высокой фармакологической активности, доказательством чему могут служить энергии Гиббса расщепления связи Н–О (табл. 4).

Таблица 4 – Свободная энергия Гиббса гомолитического разрыва связи О–Н

Структура	Индекс ненасыщенности IUA(С-3)	Энергия гомолитического разрыва связи О–Н
	0,167	–0181,29
	0,166	–178,31
	0,160	–163,08
	0,253	250

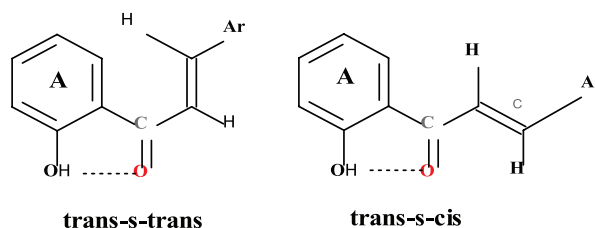
Следует отметить, что производные флавона относятся к системам с замкнутой цепью сопряжения. Хотя флаваноны тоже являются замкнутой системой, но в

них отсутствует сопряжение $\text{Ar}-\text{C}=\text{C}=\text{O}$ и по этой причине они способны при незначительном отклонении $\text{pH} > 7$ трансформироваться в соответствующие халконы:



Для халконов, как соединений с открытой цепью сопряжения, благодаря кросс-конъюгированной системе возможны различные геометрические изомеры,

из которых наиболее устойчивы производные с *trans*-конфигурацией винилового фрагмента [19, 20]:



Такие структурные особенности халконов в отличие от флавонов свидетельствуют о дополнительных центрах комплементарности к биологическому субстрату, чем можно объяснить наличие более широкого спектра фармакологической активности, а также отсутствие проокислительных свойств [21].

Связевые числа (N_μ) и индексы ненасыщенности (IUA)

В методе молекулярных орбиталей Хюккеля (МОХ) для характеристики молекул используются значения порядков связи [9], которые характеризуют относительную прочность ковалентной связи, ее длину и реакционную способность. Сумма порядков всех связей, принадлежащих данному атому, определяет связевое число (N_μ), которое характеризует степень насыщенности конкретного атома. Чем больше значение N_μ , тем выше степень насыщенности, и, наоборот, чем меньше величина N_μ , тем больше способность данного атома к образованию новых связей. Данное свойство находится в тесной связи с индексом ненасыщенности (IUA) и теоретической валентностью (V_μ), между которыми существует зависимость:

$$\text{IUA} = V_\mu - N_\mu$$

Ниже в таблице 5 в качестве примера представлены матрицы квантово-химических параметров, полученных при анализе рассматриваемых в данном сообщении соединений.

Сопоставляя между собой значения N_μ на участке $\text{C}-1 \rightarrow \text{C}-6 \rightarrow \text{C}-7 \rightarrow \text{C}-8$ циннамоильного фрагмента анализируемых соединений (табл. 6), можно сделать ряд выводов:

1. у производных 2',4'-дигидрохалкона наблюдается увеличение значения N_μ от C-1 к C-7, которое затем несколько уменьшается у C-8;
2. аналогичная картина наблюдается у производных 7-гидроксифлаванонов;
3. у 7-гидроксифлавона значения N_μ у атомов C-1

и C-6 практически одинаковые и составляют в среднем 3,769, но у C-7 наблюдается увеличение данного параметра, который в среднем достигает значения 3,803;

4. на C-8 производных 7-гидроксифлавона очень резко уменьшается величина N_μ и составляет в среднем 3,696, что свидетельствует о повышении ненасыщенности данного атома;
5. на основании полученных данных можно сделать достоверный вывод о том, что активные формы кислорода (АФК) в первую очередь будут связываться флавоноидами по положению C-8 пропенонового фрагмента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем сообщении рассмотрены представители обширной группы природных соединений – флавоноидов: халконы, флаваноны и флавоны, содержащие электронодонорные заместители в кольце «В», т.е. в ароматическом ядре циннамоильного фрагмента. Все анализируемые структуры содержат гидроксигруппу в положении 4'-халконов и в положении 7-флаванонов и флавонов*.

Анализ и сопоставление таких параметров, как связевое число (N_μ), индекс ненасыщенности (IUA), электронная плотность свидетельствует об их незначительном различии между собой, однако общим для них является высокая электронная плотность на C-8. Характерно, что в циннамоильном фрагменте $\text{C}-1 \rightarrow \text{C}-6 \rightarrow \text{C}-7 \rightarrow \text{C}-8 \rightarrow \text{C}-9$ всех трех типов структур атомы C-7 характеризуются наибольшим значением N_μ и положительным малликовским зарядом, а C-8 – наименьшим связевым числом и наибольшей электронной плотностью. Это свидетельствует о том, что первичная атака электрофильного радикала $\text{HO}\cdot$ наиболее вероятна по положению C-8.

* Соединения 14х, 14анон и 14он в природе не обнаружены и пока являются виртуальными. В одном из сообщений мы приведем методики их синтеза.

Таблица 5 – Квантово-химические параметры соединений 2-х, 2ф-анон и 2-он

Вещество 2х									
Атом (C _i)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Заряды, а.е.	0,34062	-0,26842	-0,04754	-0,23754	-0,04850	-0,23270	0,00332	-0,36401	0,54435
Связевые числа (N _μ)	3.747	3.787	3.831	3.841	3.808	3.768	3.841	3.764	3.737
Теорет. валентность (V _μ)	3.900	3.957	3.966	3.967	3.965	3.961	3.930	3.947	3.811
Индекс ненасыщенности (I _{UA})	0,153	0,170	0,135	0,126	0,157	0,193	0,089	0,183	0,074
Электронная плотность	36594	42684	40475	42375	40485	42327	39667	43640	34556
Вещество 2ф-анон									
Атом (C _i)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Заряды, а.е.	0,28456	-0,23074	-0,91736	0,19793	-0,08918	-0,18985	0,15385	-0,44670	0,52210
Связевые числа (N _μ)	3.777	3.803	3.842	3.844	3.823	3.788	3.829	3.811	3.761
Теорет. валентность (V _μ)	3.922	3.966	3.973	3.973	3.968	3.979	3.895	3.928	3.820
Индекс ненасыщенности (I _{UA})	0,145	0,163	0,131	0,129	0,145	0,191	0,066	0,117	0,059
Электронная плотность	3.7154	4.2307	4.0917	4.1979	4.0892	4.1899	3.8461	4.4487	3.4779
Вещество 2ф-он									
Атом (C _i)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Заряды, а.е.	0,34766	-0,26636	-0,04467	-0,23832	-0,03339	-0,25089	0,31826	-0,42655	0,51493
Связевые числа (N _μ)	3.759	3.784	3.833	3.838	3.808	3.727	3.792	3.709	3.792
Теорет. валентность (V _μ)	3.904	3.956	3.966	3.967	3.962	3.947	3.901	3.922	3.851
Индекс ненасыщенности (I _{UA})	0,145	0,172	0,133	0,129	0,154	0,220	0,109	0,213	0,059
Электронная плотность	3.6523	4.2664	4.0447	4.2383	4.0334	4.2509	3.6817	4.4266	3.4851

Таблица 6 – Значения связевых чисел на атомах углерода C-1→C-6→C-7→C-8*

Соединение, № п/п	2',4'-дигидроксиалкон I				7-ОН флаванон II				7-ОН флавон III			
	N _μ (C-6)	N _μ (C-7)	N _μ (C-8)	N _μ (C-1)	N _μ (C-6)	N _μ (C-7)	N _μ (C-8)	N _μ (C-1)	N _μ (C-6)	N _μ (C-7)	N _μ (C-8)	N _μ (C-1)
1	3,813	3,859	3,858	3,815	3,829	3,838	3,818	3,810	3,830	3,802	3,697	
2	3,747	3,768	3,841	3,764	3,777	3,829	3,811	3,759	3,759	3,792	3,709	
3	3,740	3,765	3,839	3,787	3,780	3,843	3,810	3,770	3,742	3,804	3,708	
4	3,750	3,763	3,862	3,820	3,763	3,838	3,815	3,747	3,747	3,807	3,701	
5	3,743	3,757	3,860	3,819	3,757	3,838	3,816	3,740	3,740	3,805	3,701	
6	3,812	3,826	3,852	3,807	3,829	3,838	3,819	3,805	3,805	3,797	3,689	
7	3,130	3,819	3,849	3,803	3,826	3,837	3,819	3,809	3,809	3,794	3,687	
8	3,805	3,833	3,857	3,881	3,766	3,838	3,818	3,749	3,749	3,804	3,695	
9	3,808	3,833	3,854	3,809	3,759	3,838	3,819	3,741	3,721	3,801	3,694	
10	3,803	3,832	3,854	3,809	3,767	3,837	3,818	3,751	3,819	3,837	3,693	
11	3,805	3,825	3,851	3,807	3,782	3,836	3,820	3,743	3,819	3,798	3,692	
12	3,740	3,833	3,861	3,818	3,752	3,838	3,816	3,739	3,826	3,806	3,699	
13	3,733	3,837	3,855	3,815	3,727	3,836	3,821	3,787	3,798	3,788	3,686	
14	3,792	3,818	3,848	3,804	3,809	3,842	3,818	3,725	3,699	3,802	3,699	

* Номера соединений соответствуют таблице 1

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не является спонсированным сторонними организациями.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Myhre O. Metal dyshomeostasis and inflammation in Alzheimer's and Parkinson's diseases: possible impact of environmental exposures / H. Utkilen, N. Duale, G. Brunborg, T. Hofer // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2013. – V. 2013. – P. 1–19. DOI: 10.1155/2013/726954.
2. Snodderly D. M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins / D.M. Snodderly // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 1995. – V. 62, №6. – P. 1448–1461. DOI: 10.1093/ajcn/62.6.1448s.
3. Thome J. Evidence for increased oxidative stress in alcohol-dependent patients provided by quantification of in vivo salicylate hydroxylation products / J. Thome, J.J. Zhang, E. Davids, P. Foley, H.G. Weijers, G.A. Wiesbeck, J. Boning, P. Riederer, M. Gerlach // *Alcoholism, clinical and experimental research*. – 1997. – V. 21. – P. 82–85. DOI: 10.1111/J.1530-0277.1997.TB03732X.
4. Агаджанян В.С. Применение квантово-химических методов анализа для интерпретации антирадикальной активности в ряду гидроксипроизводных коричной кислоты / В.С. Агаджанян, Э.Т. Оганесян // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2008. – Т. 42. – № 11. – С. 12–17. DOI: 10.30906/0023-1134-2008-42-11-12-17.
5. Оганесян Э.Т. Использование квантово-химических параметров для прогнозирования антирадикальной (но·) активности родственных структур, содержащих циннамоильный фрагмент. I. Производные коричной кислоты, халкона и флаванона / Э.Т. Оганесян, С.С. Шатохин, А.А. Глушко // *Фармация и фармакология*. – 2019 – Т. 7. – № 1. – С. 53–66. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-1-53-66.
6. Литвиненко В.И. Природные флавоноиды. В книге «Технология и стандартизация лекарств». Ростов, ООО «Рирег». – 1996. – 784 с.
7. Справочник химика в 6 томах. М.: Химия. – 1964. – Т. 3. – 1005 с.
8. Neuvonen K. Taft equation in the light of NBO computations. Introduction of a novel polar computational substituent constant scale σ^*_q for alkyl groups / K. Neuvonen, H. Neuvonen, A. Koch, E. Kleinpeter // *Computational and Theoretical Chemistry*. – 2012. – V. 981. – P. 52–58. DOI: 10.1016/j.comptc.2011.11.044.
9. Минкин В. И., Симкин Б. Я., Миняев Р. М. Теория строения молекул. Ростов-на-Дону. – 1997. – 560 с.
10. Краснов К.С. Молекулы и химическая связь. М. «Высшая школа». – 1977. – 280 с.
11. Жданов Ю.А. Теория строения органических соединений. М. «Высшая школа». – 1971. – 288 с.
12. Агаджанян В.С. Целенаправленный поиск соединения-лидера в ряду производных коричной кислоты, обладающих антирадикальной активностью / В.С. Агаджанян, Э.Т. Оганесян, В.Т. Абаев // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2010. – Т. 44. – № 7. – С. 21–26. DOI: 10.30906/0023-1134-2010-44-7-21-26.
13. Оганесян Э.Т. Использование квантово-химических методов для обоснования антирадикального (ОН·) действия полигидроксиспиртов / Э.Т. Оганесян, Е.Г. Доркина, М.Р. Хочава, В.А. Тускаев, Ю.А. Мальцев // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2002. – Т. 36. – № 12. – С. 21–25.
14. Оганесян Э.Т. Исследование механизма реакции производных флавонола с гидроксильным радикалом полуэмпирическими методами / Э.Т. Оганесян, Ю.А. Мальцев, Д.Е. Творовский // *Журнал общей химии*. – 2001. – Т. 71. – № 6. – С. 999–1005.
15. Воронков А.В. Некоторые аспекты церебропротекторной активности 4-гидрокси-3,5-ди-третбутил коричной кислоты при ишемическом повреждении головного мозга в эксперименте / А.В. Воронков, В.Т. Абаев, Э.Т. Оганесян, Д.И. Поздняков // *Медицинский вестник Северного Кавказа*. – 2018. – Т. 13. № 1.1. – С. 90–93. DOI: 10.14300/mnnc.2018.13025.
16. Воронков А.В. Оценка антиоксидантной активности 4-гидрокси-3,5-дитретбутил коричной кислоты, мексидола и тиоктовой кислоты на модели фокальной ишемии головного мозга / А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, Е.И. Хури, Ю.А. Кульбекова, А.А. Кобин // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2017. – Т. 20. – № 2. – С. 48–52.
17. Воронков А.В. Изучение дозозависимого эндотелиотропного влияния соединения АТАСЛ в условиях ишемического повреждения головного мозга у крыс в эксперименте / А.В. Воронков, Э.Т. Оганесян, Д.И. Поздняков, В.Т. Абаев // *Вестник ВолгГМУ*. – 2017. – №1(61). – С. 54–58.
18. Воронков А.В. Аспекты актопротекторной активности некоторых природных соединений различной химической структуры / А.В. Воронков, Э.Т. Оганесян, А.Д. Геращенко // *Спортивная медицина: наука и практика*. – 2017. – Т. 7. – № 1. – С. 92–96. DOI:10.17238/ISSN2223-2524.2017.1.92.
19. Иллиел Э. Основы стереохимии. – М: Бином; Лаборатория знаний. – 2014. – 120 с.
20. Цукерман С.В. Дипольные моменты с ИК-спектрами 4 и 4'-монозамещенных халконов / С.В. Цукерман, Ю.Н. Сузов, В.Г. Лаврушин // *ЖОХ*. – 1968. – Т. 38. – № 38. – С. 524–529.
21. Тараховский Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдралилов, Е.Н. Музафаров. Synchrobook, Пушино. – 2013. – 310 с.

АВТОРЫ

Оганесян Эдуард Тонинович – доктор фармацевтических наук, профессор, зав. кафедрой органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-2756-9382. E-mail: edwardov@mail.ru

Шатохин Станислав Сергеевич – аспирант кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала федерального бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-7891-8338. E-mail: Shatohin.stanislav95@yandex.ru

УДК 615.4



ПЛЕНКИ В РОССИЙСКОЙ МЕДИЦИНЕ И КОСМЕТОЛОГИИ: ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ, КЛАССИФИКАЦИЯ, ТЕХНОЛОГИЯ

Кищенко В.М., Верниковский В.В., Привалов И.М., Шевченко А.М.

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

E-mail: viktoriya.kishchenko@yandex.ru

Получено 31.01.2020

Рецензия (1) 5.04.2020

Рецензия (2) 15.04.2020

Принята к печати 10.05.2020

Аппликационные формы с момента своего появления во второй половине XX века привлекают внимание специалистов, занимающихся вопросами кожного применения фармакологически активных средств. При этом интерес вызывает как оказание локализованного воздействия на наружные покровы, так и возможность достижения системного эффекта. Широко также и диапазон применяемых в составе современных пленок средств – от фармацевтических субстанций до биологически активных компонентов косметических средств.

Цель. Настоящая работа посвящена изучению современного состояния российских исследований в области создания и совершенствования лекарственных и космецевтических пленок.

Материалы и методы. Исследование проводилось с использованием патентно-информационных (fips.ru, findpatent.ru) и информационно-поисковых баз – Государственного реестра лекарственных средств (grls.rosminzdrav.ru) и данных Федеральной службы по аккредитации (www.fsa.gov.ru), а также научных библиотек (GoogleScholar, eLIBRARY, PubMed) и справочной литературы.

Результаты. В России и за рубежом лекарственные пленки насчитывают более чем 50-летнюю историю своего существования на фармацевтическом рынке. Интерес современных ученых к данной аппликационной форме не угасает благодаря большому количеству положительных характеристик. Помимо фармацевтической сферы применения пленки получили широкое распространение в косметике, где применяются в качестве масок, наносимых на кожу. В косметических средствах широко применяются биологически активные вещества, что в последние годы привело к появлению группы космецевтической продукции, объединяющей медицинские и косметические пленки. Также в статье рассмотрены методы получения пленок, действующие вещества и полимеры, применяемые для лекарственных и косметических пленок, представленных на российском рынке.

Заключение. Проведенный анализ данных литературы позволяет сделать вывод о перспективном развитии пленок в российской медицине и космецевтике.

Ключевые слова: пленки лекарственные, биологически активные компоненты, матрица, полимеры, пленки косметические, космецевтика, классификация пленок, история развития пленок, технология изготовления пленок

FILMS IN RUSSIAN MEDICINE AND COSMETOLOGY: DEVELOPMENT HISTORY, CLASSIFICATION, TECHNOLOGY

Kishchenko V.M., Vernikovskiy V.V., Privalov I.M., Shevchenko A.M.

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

E-mail: viktoriya.kishchenko@yandex.ru

Received 31 January 2020

Review (1) 05 April 2020

Review (2) 15 April 2020

Accepted 10 May 2020

Для цитирования: Кищенко В.М., Верниковский В.В., Привалов И.М., Шевченко А.М. Пленки в российской медицине и косметологии: история развития, классификация, технология. *Фармация и фармакология*. 2020;8(2): 124-132. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-124-132

© Кищенко В.М., Верниковский В.В., Привалов И.М., Шевченко А.М., 2020

For citation: Kishchenko V.M., Vernikovskiy V.V., Privalov I.M., Shevchenko A.M. Films in russian medicine and cosmetology: development history, classification, technology. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(2):124-132. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-124-132

Since the moment of their appearance in the second half of the 20th century, application forms have attracted the attention of the specialists involved in the skin application of pharmacologically active agents. Herewith, both localized exposure to the external integuments and the possibility of achieving a systemic effect, are of interest. The range of products used in modern films, is also wide – from pharmaceutical substances to biologically active components of cosmetics.

The aim of the present work is to study the current state of research in the field of the creation and improvement of medicinal and cosmeceutical films.

Materials and methods. The study was conducted on the base of patent information (fips.ru, findpatent.ru) and information and search databases – the State register of medicines (grls.rosminzdrav.ru) and the data from the Federal accreditation service (www.fsa.gov.ru), as well as scientific libraries (Google Scholar, eLIBRARY, PubMed) and reference literature.

Results. Native and foreign medicinal films have longer than a 50-year history of their existence in the pharmaceutical market. Modern scientists' interest in this application form, does not fade away due to a great number of its positive characteristics. In addition to pharmaceutical applications, films are widely used in cosmetics in the form of masks applied to the skin. Biologically active substances are widely used in cosmetics which, in recent years, has led to the emergence of a group of cosmeceutical products that combine medical and cosmetic films. The article also discusses film manufacturing technology, active substances, as well as polymers used for medicinal and cosmetic films presented in the Russian market.

Conclusion. The analysis of the literature data makes it possible to conclude that the development of films is promising in both medicine and cosmeceuticals.

Keywords: medicinal films, biologically active components, matrix, polymers, cosmetic films, cosmeceutics, classification of films, history of film development, film manufacturing technology

ВВЕДЕНИЕ

Аппликация (от лат. *applicatio* – прикладывание) как способ применения лекарственных и косметических средств и изделий медицинского назначения известна с древнейших времен. Под аппликационными препаратами понимают лекарственные формы и иные изделия, наносимые на кожу, слизистые оболочки или поверхности ран и так или иначе фиксирующиеся на них. Такой способ применения, в зависимости от используемых действующих компонентов, вспомогательных веществ и конструктивных особенностей аппликационного препарата, позволяет добиваться как локализованного, так и системного действия на организм человека. Причем последнее позволяет рассматривать аппликационные препараты уже не с точки зрения традиционных лекарственных форм, а как системы доставки [1]. При этом одним из перспективных направлений развития топикальных лекарственных форм и трансдермальных систем доставки лекарственных средств являются самофиксирующиеся аппликационные лекарственные формы и, в частности, пленки.

Цель исследования – изучение современного состояния российских исследований в области создания и совершенствования лекарственных и косметических пленок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводилось с использованием патентно-информационных (fips.ru, findpatent.ru) и информационно-поисковых баз – Государственного реестра лекарственных средств (grls.rosminzdrav.ru) и данных Федеральной службы по аккредитации (www.fsa.gov.ru), а также научных библиотек (GoogleScholar, eLIBRARY, PubMed) и справочной литературы. Глубина поиска литературных источников составляла 21 год, а глубина патентного поиска – 17

лет. В ходе поиска материалов использовались следующие формулировки поисковых запросов: «пленки лекарственные», «пленки», «cosmetic films», «films».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

История пленок как формы выпуска лекарственных и косметических средств насчитывает более 50 лет. Впервые в нашей стране пленки как лекарственная форма появились в 60-х годах XX века, причем область их применения ограничивалась офтальмологической практикой [2]. На зарубежном фармацевтическом рынке пленки были официально представлены в 1970 году в качестве замены быстрорастворимых таблеток [3]. В российской фармации официальное определение лекарственной формы «пленки» впервые появилось в Государственной фармакопее VIII издания в общей фармакопейной статье, посвященной глазным лекарственным формам, где были выделены «твердые глазные лекарственные формы для местного применения – пленки глазные» [4]. Однако уже в XIV издании Государственной фармакопии пленки были выделены в отдельную общую фармакопейную статью как самостоятельная лекарственная форма. Согласно определению действующей фармакопии, пленки – это твердая дозированная лекарственная форма, представляющая собой тонкие пластинки подходящего для применения размера, содержащие одно или несколько действующих веществ и вспомогательные, в том числе пленкообразующие, вещества. Была расширена и сфера применения пленок как лекарственной формы лекарственных средств – в зависимости от способа применения и пути введения различаются пленки глазные и пленки для применения в полости рта [5].

Пленки как любая лекарственная форма имеет целый ряд положительных и отрицательных качеств, определяющих область их применения (табл. 1) [6].

Таблица 1 – Достоинства и недостатки пленок как лекарственной формы

Достоинства:	Недостатки:
Технологические: • производство пленок не требует технологически сложного оборудования; • возможность сочетания различных групп действующих веществ; • удобство применения из-за уменьшения частоты приема (при пролонгированном высвобождении); • достаточная мобильность для самостоятельного применения пациентом. Фармакологические: • возможность пролонгирования эффекта действующих веществ; • поддержание постоянной концентрации действующих веществ; • возможное снижение терапевтически активной дозы; • в случае необходимости доза действующего вещества может быть увеличена путем нанесения дополнительной пленки; • снижение или исключение побочных эффектов; • действующее вещество проникает в системный кровоток с уменьшенным эффектом первого прохода печени.	• сложность включения в состав пленок значительных количеств действующих веществ; • низкая скорость пассивной диффузии в ряде случаев требует использования специальных вспомогательных веществ – пенетраторов; • действующие вещества природного происхождения могут образовывать прочные комплексы с рядом вспомогательных веществ, что может приводить к снижению фармакотерапевтической активности; • ограниченность выбора и высокая стоимость материалов упаковки; • в процессе хранения пленки могут изменять свои свойства, если упаковка подобрана неправильно (теряют влагу, отсыревают).

Однако, как следует из таблицы 1, положительные стороны лекарственной формы могут быть также ее недостатками в некоторых случаях. Например, размер лекарственной формы позволяет ей быть достаточно мобильной и удобной в применении, но так как пленки – компактная форма, из-за своего размера они обладают ограниченной емкостью по отношению к действующим компонентам. Также пленки могут содержать в своем составе сочетания действующих веществ, что является несомненным положительным свойством данной формы, однако, в таком случае, подбор состава осложняется тем, что не только действующие вещества должны быть индифферентны друг к другу, но и полимер основы в процессе изготовления с большей вероятностью может связывать действующие вещества и препятствовать тем самым их высвобождению.

Проведенный анализ литературы показал, что наиболее проработанными вопросы классификации являются для пленок как лекарственной формы, в то время как в случае косметических пленок классификации не уделяется достаточного внимания. Возрастающий интерес исследователей и обширность областей применения лекарственной формы «пленки» продиктовали необходимость создания классификаций по различным признакам.

Например, подробная классификация пленок была представлена профессором Э.А. Коржавых. Согласно ей лекарственные пленки можно классифицировать по четырем основным признакам:

1. По пути введения: буккальные, вагинальные, глазные, дентальные, дерматологические, интраокулярные.
2. По составу: коллагеновые, фибринные, фитопленки.

3. По свойствам полимера: нерастворимые и быстрорастворимые
4. По другим признакам: импрегнированные, распыляемые и пленки с модифицированным высвобождением.

Одной из выделяемых групп пленок являются пленки с модифицированным высвобождением. Пролонгированное высвобождение действующих компонентов из пленок осуществляется благодаря применению определенных полимеров и их сочетаний. Так, были опубликованы результаты биофармацевтического исследования реминерализующих пленок с тримекаина гидрохлоридом и хлоргексидина биглюконатом на четырех основах (натрий-карбосиметилцеллюлозе, натрия альгинате, Blanose 7MF, Blanose 7M8SF) и пленки реминерализующего действия с кальция хлоридом, натрия фосфатом двузакисным и натрия фторидом на основе метилцеллюлозы. Результаты данного исследования показали, что скорость высвобождения действующих веществ из различных основ не одинакова: пролонгированным высвобождением действующих веществ обладала основа с натрия альгинатом, а основа Blanose 7M8SF обеспечивала, напротив, ускоренное высвобождение, так как данная полимерная основа обладала большей способностью к набуханию и, соответственно, более быстрому растворению [8]. Быстрота высвобождения действующих веществ из соответствующих полимерных основ может являться одним из преимуществ пленок. Ускоренное высвобождение, например, актуально для орально дисперсных лекарственных средств, содержащих нитроглицерин или лоратидин [3, 9].

Обработка экспериментальных данных высвобо-

ждения действующих веществ из пленок позволила разработать математическую модель данного процесса. Так, математический анализ процесса высвобождения действующего компонента из гидрофильной матрицы (в частности, на основе хитозана), помещенной в воду, проводился А.О. Сыромясовым и соавт. В результате была предложена математическая модель диффузии вещества из одномерной гидрофильной пленки, учитывающая влияние на данный процесс разнонаправленных факторов: зависимости свойств матрицы от концентрации в ней действующего компонента, обусловленной явлением частичного связывания действующего компонента внутри матрицы, и зависимости свойств матрицы от времени, связанной с ее набуханием и возможным растворением в водной среде [10].

С момента своего появления пленки подверглись значительным модификациям, например, с точки зрения высвобождения действующего компонента. Это позволяет относить их к так называемым «инновационным лекарственным формам», а вопросы разработки новых составов и совершенствования технологии данной аппликационной формы считать одними из актуальных вопросов современной фармации [11, 12].

В настоящее время в России учеными разработано значительное количество композиций полимерных лекарственных пленок, обладающих различными эффектами: антимикробным, противовирусным, иммуномодулирующим, оказывающим влияние на сердечно-сосудистую систему, а также применяющихся для местной анестезии [9, 13, 14]. Современные пленки могут содержать в качестве действующего вещества фитопрепараты, ферменты и другие лекарственные средства для лечения глазных, стоматологических, дерматологических, оториноларингологических, гинекологических, онкологических заболеваний, ожогов, ран, алкоголизма, наркомании, депрессий, стенокардии и др. [2, 15–18].

Большой интерес исследователей привлекают пленки для применения в полости рта, содержащие действующие компоненты природного или синтетического происхождения или их сочетания. Так, был разработан состав и стандартизирована технология получения стоматологических пленок с бишофитом, обладающих противоотечным действием [19].

Проведено исследование по созданию двухслойных стоматологических пленок, обладающих обезболивающим, противовоспалительным и антимикробным действием. В качестве действующих веществ авторы использовали в составе данных пленок новокаин, норсульфазол-натрий и сок каланхоэ, а для создания модельных матриц лекарственной формы был использован ряд полимеров: желатин, метилцеллюлоза, поливиниловый спирт и натрий-карбоксиметилцеллюлоза. Для выбора оптимальной основы пленкообразователи сравнивали между собой, исхо-

дя из их органолептических свойств. Исследование показало, что оптимальной основой для новокаина является 3% раствор метилцеллюлозы, а для норсульфазола наиболее подходит 6% раствор поливинилового спирта [20].

Опубликованы результаты по физико-химическому исследованию и получению стоматологических пленок на основе коллагена и желатина, содержащих в составе 30% хлоргексидина. Было установлено, что на процесс гелеобразования при получении матрицы пленки оказывает влияние концентрация, начальная температура студнеобразования, скорость процесса охлаждения и содержание вспомогательных добавок [21]. Скорость гелеобразования возрастала, если процесс начинался при более низкой температуре. В режиме свободного охлаждения раствора желатина (на воздухе от 38°C до температуры окружающей среды, составлявшей 24°C) происходило изменение его структуры, конечной точкой которого являлось застуднение. Время осаждения желатиновой массы при застывании составило 60 минут. Структурообразование коллагена из тонкого слоя раствора в начальный период определялось характером испарения чистых растворителей. Данный процесс достаточно длительный – авторами указано, что за 100 минут из общей массы произошло удаление только 23% жидкой фазы [21].

Для профилактики и лечения заболеваний пародонта была разработана лечебно-профилактическая пленка с матрицей на основе поливинилового спирта и действующим компонентом – витамином D₃. Для данной композиции были проведены исследования механической прочности разработанного состава, которые показали, что при совместном введении пленкообразователя (поливинилового спирта), пластификатора (глицерина) и действующего вещества (витамина D₃) прочность пленки увеличивается на 10%. Также изучено влияние витамина D₃ на функциональную активность клеток, выделенных из пародонтального кармана. Исследования показали, что витамин D₃, высвобождающийся из пленки, значительно ограничивал продукцию медиаторов воспаления [22].

С целью коррекции гингивита, пародонтита и пародонтита разрабатывались составы лекарственных пленок с меланином чаги (*Inonotus obliquus* (Ach. ex Pers.) Pil.) и хлоргексидином на основе композиции полимеров – поливинилового спирта и полисахарида зостерина. Разработанные стоматологические пленки подвергались испытаниям по показателю «влажность» и исследованию времени растворения. Результаты экспериментов показали, что оптимальные показатели влажности для стоматологических пленок находились в пределах 6–12%. Также было установлено, что введение в состав композиции хлоргексидина снижало растворимость на 8% [23]. Матрица на основе поливинилового спирта исполь-

зовалась и для разработки состава стоматологических лекарственных пленок, содержащих в качестве действующих веществ магния хлорид и цинк-замещенный гидроксипатит кальция [24].

Для депонирования лекарственных веществ на поверхности слизистой оболочки носа и верхнечелюстного синуса была разработана адгезивная полимерная растворимая пленка, содержащая композицию лидокаина гидрохлорида и полисорба МП. В качестве матрицы было выбрано сочетание полимеров оксипропилметилцеллюлозы и пектина. Интерес представляет то, что были проведены клинические исследования специфической активности предложенной композиции на группе пациентов. В результате было определено, что разработанная пленка способствует более быстрой эпителизации слизистой оболочки носа и верхнечелюстного синуса [25]. Опубликованы результаты по разработке оптимального состава пленки на основе фитокомпозиции (смесь сухих экстрактов календулы и тысячелистника) с добавлением настойки прополиса для лечения травматических поражений слизистой оболочки ротовой полости, в качестве пленкообразователя в которой использовался желатин с добавлением в качестве пластификатора глицерина [26].

Лекарственные пленки используются также в детской стоматологической практике. Так, разработаны составы и технологии пленок, обладающих анестезирующим и противовоспалительным действием. В качестве действующих компонентов в данных композициях использовали субстанцию тримекаина и водное извлечение из цветков ромашки, в качестве матрицы – композицию натрий-карбоксиметилцеллюлозы, желатина и полиэтиленоксида-600 [27, 28].

Помимо стоматологической области, пленки также широко применяют в офтальмологии. Например, опубликованы результаты исследования по выбору состава офтальмологических пленок с экстрактом алоэ жидким для коррекции воспалительных заболеваний конъюнктиве глаза. В качестве полимеров для создания пленочной основы были рассмотрены поливинилпирролидон, карбоксиметилцеллюлоза и полиэтиленоксид-400. Выбор оптимального состава проводился с помощью оценки следующих параметров: влажности, линейных размеров, pH, а также привлекательности внешнего вида получаемой пленки. В результате исследований было установлено, что наилучшими совокупными характеристиками обладала пленка на основе карбоксиметилцеллюлозы [29].

Лекарственные пленки применяются не только для лечения человека, но и для коррекции заболеваний у животных. Предложены полимерные лекарственные пленки для лечения глаз животных с моксифлоксацином и основой из композиции поливинилового спирта и арабиногалактана. Изучение кинетики высвобождения лекарственного вещества

из модельных основ, проведенное спектрофотометрическим методом, показало, что исследуемая композиционная основа обладает более выраженным пролонгирующим эффектом по сравнению с пленкой на основе чистого поливинилового спирта [30, 31].

Несмотря на активно проводимые учеными исследования по разработке лекарственных пленок, на российском фармацевтическом рынке эта форма выпуска представлена относительно ограниченно. Если обратиться к Государственному реестру лекарственных средств, то он содержит только пять зарегистрированных лекарственных препаратов, выпускаемых в данной форме. Это два варианта наклеиваемых на десну пленок с нитроглицерином «Тринитролонг», предназначенных для профилактики и купирования приступов стенокардии, на основе матрицы из полимера биорастворимого для лекарственных пленок, представляющего собой сополимер акриламида, N-поливинилпирролидона и этилакрилата. Два других лекарственных препарата представляют собой оральнодисперсные пленки с силденафилом «Инвида ОДП» и «Динамико Форвард», предназначенные для коррекции эректильной дисфункции. В качестве пленкообразователя в этих лекарственных препаратах используется пищевой полисахарид пуллулан. В данных случаях форма пленки является своеобразным аналогом таблеток, имея перед последними преимущество в виде простой технологии, позволяющей более гибко регулировать кинетику высвобождения. Что касается пятого зарегистрированного в форме пленок лекарственного препарата, то это глазные пленки «Таурин», используемые для коррекции дистрофии и травм роговицы глаза, также созданные на основе матрицы из биополимера растворимого для лекарственных пленок.

Простота и высокая технологичность пленок позволяет использовать их не только как лекарственные средства, но и как перевязочные материалы. В разное время ученые проводили исследование рынка перевязочных материалов, выделяя при этом группу «лекарственные пленки» и показывая тем самым актуальность их использования и определенный интерес к совершенствованию данной формы выпуска лекарственных средств [2, 18, 32, 33].

В настоящее время в России пленки используют не только в медицинской практике – на косметическом рынке они также заняли довольно устойчивое положение. Так, по данным Россаккредитации на момент 21 августа 2019 г. на парфюмерно-косметическом рынке косметические средства включали в себя более 162000 наименований продукции (100%). Подгруппа «средства по уходу за кожей» состояла из более чем 22700 наименований, что составляло примерно 14% от всех косметических средств. В свою очередь среди средств по уходу за кожей выделяются «маски для лица» (более 3500 наименований или 2,2% от общего числа косметических средств), в

числе которых были выделены «маски-пленки» в количестве примерно 0,01% от общего количества косметических средств, представленных на российском рынке. Несмотря на столь малую долю в относительных показателях, в абсолютном выражении на российском косметическом рынке представлено более 150 наименований масок-пленок, что многократно превосходит число лекарственных препаратов, реализуемых в данной форме в России.

Не являясь лекарственными средствами, косметические маски-пленки могут содержать такие же биологически активные вещества, как и лекарственные формы, однако в гораздо меньшей концентрации, тем самым оказывая благоприятное воздействие на кожный покров. Такие маски способствуют устранению сухости и шелушений кожного покрова, регуляции работы сальных желез и т.д. При этом они не оказывают токсичного воздействия на организм потребителя из-за содержания действующих веществ в концентрациях гораздо более низких, чем в лекарственных препаратах (в большинстве случаев концентрация составляет около 0,5% и менее) [34–36]. Использование в косметических средствах биологически активных компонентов привело к появлению термина «космецевтика», обозначающего косметическую продукцию, содержащую в составе компоненты, обладающие выраженной биологической активностью. Более 20 лет назад данный термин ввел американский дерматолог Альберт Клигман, соединив понятия «фармацевтика» и «косметика». Космецевтические средства отличаются от косметических главным образом тем, что не маскируют несовершенства кожного покрова, а устраняют причину их появления. Также космецевтические средства оказывают действие на слои кожи вплоть до гиподермы, тогда как косметические, как правило, способны проникать не дальше дермы [37, 38].

Анализ ассортимента биологически активных веществ, включаемых в состав космецевтических средств, показал, что они имеют преимущественно природное происхождение, в то время как синтетические соединения практически не используются. К компонентам животного происхождения, включаемым в состав косметических продуктов, относится, например, ряд продуктов пчеловодства, таких как пыльца, оказывающая антиоксидантное, противовоспалительное, антиканцерогенное, антибактериальное, антифунгицидное действие [39]; продукты переработки трутневого расплода, который замедляет процессы старения кожи; маточное молочко, применяющееся как средство с высоким регенеративным показателем [40]. Достаточно распространенным в настоящее время является такой активный компонент как улиточный муцин, который может применяться для лечения различных видов ожогов, дерматитов, экземы, сыпи подгузника и для лечения ран [41–43]. Опубликовано исследование потреби-

тельских свойств косметических масок с коллагеном, который выступает не только как пленкообразователь, но и как активный ингредиент [46]. Однако помимо этих довольно специфических составляющих в космецевтических пленках присутствуют компоненты, встречающиеся практически в каждом косметическом средстве – гуанин, кератин и др. [44, 45].

Кроме биологически активных веществ животного происхождения, в косметике активно применяют растительные компоненты: розовую воду, экстракты ромашки, василька, календулы и др., а также растительные масла (в том числе и эфирные). Продукты, полученные из алоэ вера и алоэ древовидного, являются одними из наиболее часто встречающихся в составах дерматологических масок-пленок. Сок и экстракты алоэ в косметической промышленности применяют для стимулирования регенерации кожных покровов, предотвращения дерматитов различного генеза.

Было проведено исследование частоты применения полимеров в составе косметических средств, в том числе образующих пленки на месте применения, содержащих природные минеральные соли, показавшее, что наиболее применимыми для данных композиций являются поливинилпирролидон, ксантановая камедь, производные целлюлозы и карбомеры [47].

В качестве матрицы для создания пленок используют полимеры природного, полусинтетического и синтетического происхождения, что позволяет разделить пленкообразователи на соответствующие группы [48]:

- животного происхождения (коллаген, желатин, эластин, хитозан);
- растительного (альгинаты, целлюлоза, пектин, камеди);
- микробного (агар-агар, декстрин, пуллулан);
- полусинтетические (метилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза, окипропилэтилцеллюлоза, модифицированные крахмалы);
- синтетические (поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиэтиленоксиды, полиакриламиды, карбомеры).

Чаще всего при изготовлении пленок как лекарственных препаратов используют производные целлюлозы (метилцеллюлозу и др.), желатин и агар [29, 49, 50]. В космецевтических же масках-пленках в качестве полимеров основы чаще всего встречается альгинат натрия и поливиниловый спирт [51].

Помимо вспомогательных веществ, составляющих основу, в состав пленок включают пластификаторы (глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, касторовое масло, твины), консерванты (спирт этиловый, нипагин, бензалкония хлорид) пенетраторы (диметилсульфоксид, диметилформамид), коррективы запаха и вкуса, регуляторы pH, солибулизато-

ры (твин-80, полиэтиленгликоль 1500, глицерам) и др., которые обеспечивают оптимальные технологические, химические, физико-химические и фармакологические показатели пленок.

Кроме формообразующих и вспомогательных ингредиентов, пленки лекарственные и косметические объединяют процессы изготовления пленок. В настоящее время применяются следующие методы формования пленок:

- пульверизация;
- выливание;
- экструзия.

Метод пульверизации заключается в распределении с помощью распылителя (пульверизатора) полимерной основы по подложке с постоянным высушиванием в интенсивном потоке теплого воздуха. Получаемые таким способом пленки высыхают быстрее, однако пленочная масса также может распределяться неравномерно, и готовые пленки на этапе сушки могут не соответствовать по органолептическим показателям. При изготовлении пленок методом выливания раствор полимера распределяют по подложке, после чего высушивают либо в камерных сушилках, либо при комнатной температуре. Недостатком этого метода является неравномерное высыхание пленки: в процессе сушки слой, находящийся на поверхности, высыхает быстро и препятствует

удалению влаги из нижележащих слоев, в результате чего пленка может получиться неравномерной. Данного недостатка можно избежать, используя при настройке оборудования выставленные по уровню формы, а также сушилки для ускорения процесса высыхания. При экструзионном формовании пленочную массу под давлением продавливают через формующую форсунку, получая пленку требуемой толщины [5], однако недостатком данного метода является образование включений пузырьков воздуха в пленочной массе при экструзии. Данный недостаток можно скорректировать, включив в процесс производства стадию вакуумирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный обзор российских исследований позволил сделать заключение о стремительном совершенствовании пленок и их достаточном представителе в российских классификациях лекарственных и косметических средств. Исходя из данных российского рынка парфюмерно-косметических средств, пленки являются актуальной и востребованной формой, в то время как на фармацевтическом рынке они представлены крайне ограниченно. Основываясь на ряде обоснованных преимуществ пленок, можно предположить, что данная форма оптимальна для применения в косметологии.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не является спонсированным сторонними организациями.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кривошеев С.А. Аппликационные лекарственные формы: Пластыри / С.А. Кривошеев, И.А. Девяткина, Н.Б. Демина / Под общ. ред. В.А. Быкова. – М: МАКС Пресс, 2005. – 104 с.
2. Ерофеева Л.Н. Лекарственные пленки. История и современность. / Л.Н. Ерофеева // Университетская наука: взгляд в будущее: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 83-летию Курского государственного медицинского университета (2 февраля 2018 года) / Под ред. ректора КГМУ, Заслуженного врача РФ, профессора, д.м.н. В.А. Лазаренко. В 2-х томах. – Том II. – Курск: ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России. – 2018. – С. 52–27.
3. Narayana P.R. Formulation and Evaluation of Fast Dissolving Films of Loratidine by Solvent Casting method / M.S. Kumar, M. Reddy, K. Ravishankar // The Pharma Innovation J. – 2013. – V. 2, №1. – P. 31–35.
4. Государственная Фармакопея РФ. – 13 изд. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea13.php> (дата обращения: 1.12.2018).
5. Государственная Фармакопея РФ. – 14 изд. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения: 12.12.2019).
6. Кищенко В.М. Разработка состава и стандартизация дерматологических пленок с алоэ и актовегином / В.М. Кищенко // Сб. матер. Междунар. науч. конф. «Молодые ученые – медицине» (20–21 мая). – 2016. – С. 136–139.
7. Кафедра хирургии медико-профилактического факультета Первого Московского Медицинского Университета им. И.М. Сеченова, 2014 г. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.surgerymf.com> (дата обращения: 29.11.2016)
8. Рюмина Т.Е. Биофармацевтические исследования пленок лекарственных анестезирующего и реминерализирующего действия / Т.Е. Рюмина, А.Л. Голованенко // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 1. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5430> (дата обращения: 02.02.2012)
9. Мизина П.Г. Фитопленки в фармации и медицине / П.Г. Мизина // Фармация. – 2000. – № 5–6. – С. 38–40.
10. Сыромясов А.О. Модель диффузии лекарственного вещества с учетом его связывания в органической пленке / А.О. Сыромясов, А.С. Шуршина, Д.В. Галкин // В сборнике: Математическое моделирование, численные методы и комплексы программ имени Е.В. Воскресенского VIII Международная научная молодежная школа-семинар. – 2018. – С. 150–155.
11. Степанова Э.Ф. Создание и фармакотехнологические

- исследования инновационных лекарственных форм мексидола / Э.Ф. Степанова, С.О. Лосенкова, Ю.А. Морозов // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – № 4 (25). – С. 37–43.
12. Сысуев Б.Б. Современное состояние исследований разработок в области инновационных лекарственных форм и их модификаций / Б.Б. Сысуев, И.В. Плетнева // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014. – № 4 (52). – С. 7–12.
 13. Олешко, Л.Н. Выбор состава стоматологических пленок анестезирующего действия / Л.Н. Олешко [и др.] // Фармация. – 1999. – № 6. – С. 30–32.
 14. Панкрушева Т.А. Полимерные лекарственные пленки для лечения заболеваний слизистых оболочек / Т.А. Панкрушева // Ученые записки Орловского госуд. ун-та. Серия: «Естественные науки». – 2014. – № 7 (63). – С. 211–212.
 15. Саушкина А.С. Перспективы использования стоматологических лекарственных пленок с аскорбиновой кислотой и рутином для лечения и профилактики заболеваний пародонта / А.С. Саушкина, Л.Н. Савченко, Б.А. Чакчир, Т.Ф. Маринина // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2013. – № 3(43). – С. 118–125.
 16. Пискунов, С.З. Разработка и исследование пленок для лечения ринитов / С.З. Пискунов, Л.Н. Ерофеева // Российская ринология. – 2015. – № 3. – С. 54–56.
 17. Камаева С.С. Разработка состава лекарственных пленок с хлоргексидинабиглюконатом / С.С. Камаева, Л.А. Поцелуева, Р.С. Сафиуллин, Е.В. Егорова // Фармация. – 2007. – № 2. – С. 20–22.
 18. Винник Ю.С. Современные раневые покрытия в лечении гнойных ран / Ю.С. Винник, Н.М. Маркелова, Н.С. Соловьева, Е.И. Шишадкая, М.Н. Кузнецов, А.П. Зуев // Новости хирургии. – 2015. – Т. 23. – № 5. – С. 552–558.
 19. Вдовина Г.П. Влияние новой лекарственной формы бишофита на скорость кровоснабжения в мягких тканях пародонта у крыс в условиях экспериментального воспаления / Г.П. Вдовина, Л.М. Ганичева, Е.В. Меркулова // Пермский медицинский журнал. – 2006. – №2. – С. 58–60.
 20. Маринина Т.Ф. Разработка технологии и анализ двухслойных стоматологических пленок противовоспалительного и анестезирующего действия [Электронный ресурс] / Т.Ф. Маринина, Х.Н. Гольбякова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4. – Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=13902> (дата обращения: 11.07.2014)
 21. Васильев М.П. Получение и исследование коллагеновых пленочных материалов для стоматологии / М.П. Васильев, Г.А. Алексеева // Вестник молодых ученых Санкт-Петербургского государственного университета технологии и дизайна. – 2017. – № 3. – С. 56–60.
 22. Островская Л.Ю. Состав для получения стоматологической лечебно-профилактической пленки / Л.Ю. Островская, Л.С. Катханова, А.В. Лысов, Н.Б. Захарова, В.А. Кошуро, С.Я. Шичхидзе // В сборнике: Молодежь и XXI век – 2015 материалы V Международной молодежной научной конференции: в 3-х томах. Ответственный редактор: Горохов А.А. – 2015. – С. 79–81.
 23. Латипова А.Д. Разработка состава лекарственных пленок для стоматологии / А.Д. Латипова, Е.В. Сысоева, М.А. Сысоева // Вестник технологического университета. – 2016. – Т. 19, №22. – С. 168–171.
 24. Пат. 2651041 Российская Федерация, МПК А61К 6/00, А61К 9/70. Состав и способ для получения биоактивной стоматологической лечебно-профилактической пленки / Булкина Н.В., Вулах Н.А., Кропотина А.Ю., Кадыков А.Л., Попова О.В., Пичхидзе С.Я.; заявитель и патенто-
 бладатель Саратовский государственный технический университет имени Гагарина Ю.А. – №2016143505; заявл. 03.11.2016; опубл. 18.04.2018; Бюл. № 11. – 8 с.
 25. Пат. 2634259 Российская Федерация, МПК А61К 9/00, А61К 31/167, А61К 33/00, А61К 47/36, А61К 47/38. Адгезивная полимерная растворимая пленка для депонирования лекарственных веществ на поверхности слизистой оболочки носа и верхнечелюстного синуса / Сирак С.В., Кошель И.В., Кошель В.И.; заявитель и патентообладатель Ставропольский государственный медицинский университет. – №2016115425; заявл. 20.04.2016; опубл. 24.10.2017; Бюл. № 30. – 4 с.
 26. Аверьянов С.В. Применение стоматологической пленки для лечения поражений слизистой оболочки полости рта / С. В. Аверьянов, К.А. Хайрзаманова // DentalForum. – 2018. – № 4. – С. 11.
 27. Беспалова А.В. Разработка технологической схемы получения детских стоматологических пленок анестезирующего и противовоспалительного действия / А.В. Беспалова // В сборнике: Applied and Fundamental Studies proceedings of the 11-th International Academic Conference. – 2017. – С. 118–125.
 28. Сампиев А.М. Разработка состава и технологии детских стоматологических пленок анестезирующего и противовоспалительного действия / А.М. Сампиев, А.В. Беспалова, А.В. Никифорова // Запорожский медицинский журнал. – 2017 – Т. 19. – № 5(104). – С. 668–674. DOI: 10.14739/2310-1210.2017.5.110230
 29. Шикова, Ю.В. Разработка состава и технологии глазных лекарственных пленок с экстрактом алоэ / Ю.В. Шикова [и др.] // Фармация и фармакология. – 2016 – Т. 4. – №4. – С. 48–54.
 30. Бадыкова Л.А. Применение полимерных композиций в качестве глазных лекарственных пленок в ветеринарии / Л.А. Бадыкова // Достижения химии в агропромышленном комплексе: материалы Всероссийской молодежной конференции-школы с международным участием. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2015. – 63–64 с.
 31. Бадыкова Л.А. Применение глазных лекарственных пленок в ветеринарии / Л.А. Бадыкова, Р.Х. Мударисова // В сборнике: Достижения химии в агропромышленном комплексе материалы IV Всероссийской молодежной конференции-школы с международным участием. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2018. – С. 144–147.
 32. Сампиев А.М. Современное состояние исследований в области создания стоматологических пленок / А.М. Сампиев, Е.Б. Никифорова, А.В. Соповская // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 3–2. – С. 293–297.
 33. Майорова А.В. Современный ассортимент, свойства и перспективы совершенствования перевязочных средств для лечения ран / А.В. Майорова, Б.Б. Сысуев, И.А. Ханалиева, И.В. Вихрова // Фармация и фармакология. – 2018. – Т. 6. – № 1. – С. 4–16.
 34. Балдынова Ф.П. Исследование и разработка косметической маски на основе ферментированных цветков ромашки аптечной / Ф.П. Балдынова, А.В. Бызгаева // Химия и химическая технология переработки растительного сырья: материалы докладов Международ. науч.-технич. конф. – Минск: БГТУ, 2018. – С. 222–225.
 35. Беженор Х.Д. Разработка состава и технологии косметической очищающей маски-пленки на основе бадяги / Х.Д. Беженор, Н.А. Чупятова, П.В. Майорова, М.С. Гутникова // Молодежь, наука, медицина: материалы 63-й всероссийской межвузов. студен.науч. конф. с междунар. участием / Твер. гос. мед. ун-т; ред. кол.: М. Н. Калинин [и др.]. – Тверь: Ред.-изд. центр Твер. гос. мед. ун-т, 2017. – С. 636–637.

36. Дрибноход Ю.Ю. Косметология / Ю.Ю. Дрибноход. – Изд. 13-е. – Ростов н/Д: Феникс, 2017. – 798 с.
37. Шадрина, В.О. Специфика реализации космецевтики в РФ / В.О. Шадрина // Бизнес-образование в экономике знаний [Электронный ресурс]. – 2016. – №3 (5). – С. 70–73. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/spetsifika-realizatsii-kosmetsevtiki-v-rf> (дата обращения: 05.11.2016).
38. Xi X. The Potential of Using Bee Pollen in Cosmetics: a Review / X. Xi [et al.] // J Oleo Sci. – 2018. – V. 67, №9. – P. 1071–1082. DOI: 10.5650/jos.ess18048.
39. Xi X, Li J, Guo S, Li Y, Xu F, Zheng M, Cao H, Cui X, Guo H, Han C. The Potential of Using Bee Pollen in Cosmetics: a Review / X. Xi, J. Li, S. Guo, Y. Li, F. Xu, M. Zheng, H. Cao, X. Cui, H. Guo, C. Han // Journal of Oleo Science. – 2018 – V. 67, № 9. – P. 1071–1082. DOI: 10.5650/jos.ess18048.
40. Пат. 2208434 Российская Федерация, МПК А61К7/48, А61К35/64. Косметическая лечебно-профилактическая крем-маска с трутневым расплодом и маточным молочком, обладающая противовоспалительным и ранозаживляющим действием / Лазарян Д.С., Сотникова Е.М., Линникова В.А., Лазарян Г.Д.; заявитель и патентообладатель Пятигорская государственная фармацевтическая академия. – № 2001114383/14; заявл. 24.05.2001; опубл. 20.07.2003, Бюл. № 20. – 6 с.
41. Саяпова, А.И. Свойства экстракта улитки в составе косметических средств / А.И. Саяпова // Инновации и наука: проблемы и перспективы сборник статей [Электронный ресурс]. – М.: Импульс, 2018. – С. 180–183. – Режим доступа: <http://impulse-science.ru/wp-content/uploads/2018/12/%D0%A9A-29.pdf>. (дата обращения: 23.12.2018)
42. Newar, J. Studies on the Adhesive Property of Snail Adhesive Mucus / J. Newar, A. Ghatak // Langmuir. – 2015. – V. 31, №44. – P. 12155–12160. DOI:10.1021/acs.langmuir.5b03498.
43. Ruiz, M.A. Preparation and stability of cosmetic formulations with an anti-aging peptide / M.A. Ruiz, B. Clares, M.E. Morales, S. Cazalla // Journal of Cosmetic Science. – 2007. – V. 58, № 2. – P. 157–171.
44. Пат. 2678307 Российская Федерация, МПК А61К 8/00, А61К 8/18, А61К 8/34, А61К 8/36, А61К 8/42, А61К 8/67, А61К 8/64, А61Р 17/10, А61Q 19/00. Активная против акне добавка к парфюмерно-косметическим продуктам / Волков К.В.; заявитель и патентообладатель Талагаева Е.В. – № 2018139909; заявл. 13.11.2018; опубл. 25.01.2019 Бюл. № 3. – 16 с.
45. Mokrejs, P. The cosmetic and dermatological potential of keratin hydrolysate / P. Mokrejs, M. Hutta, J. Pavlackova, P. Egner, L. Benicek // J. Cosmet. Dermatol. – 2017. – V. 16, №4. – P. 21–27. DOI: 10.1111/jocd.12319.
46. Сапожникова А.И. Оценка потребительских свойств косметических масок с коллагеном / А.И. Сапожникова, Е.Л. Пехташева, Е.В. Щукина // Вестник российского экономического университета им. Г.В. Плеханова. – 2010. – №1(31). – С. 118–124.
47. Возможности и специфика использования полимеров в качестве вспомогательных веществ в составе косметических средств на основе природных минеральных солей / Б.Б. Сысуев, С.Б. Евсеева // Фармация и фармакология. – 2017. – Т. 5. – № 2. – С. 98–116.
48. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Sixth edition. Edited by Raymond C Rowe, Paul J. Sheskey and Marian E. Quinn. P. – 2006. – P. 129–133.
49. Rubilar, J.F. Physical properties of emulsion based hydroxypropyl methylcellulose/whey protein isolate (HPMC/WPI) edible films / J.F. Rubilar, R.N. Zuniga, F. Osorio, F. Pedreschi // Carbohydrate Polymers. – 2015. – V. 123. – P. 27–38. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.01.010.
50. Аверьянов, С.В. Применение стоматологических пленок при заболеваниях слизистой полости рта / С.В. Аверьянов, К.А. Хайрзаманова, И.Р. Исхаков, А.И. Исаева // Успехи современной науки. – 2017. – Т. 5. – № 1. – С. 99–104.
51. Пат. 2702907 Российская Федерация, МПК А61К 8/73, А61К 8/92, А61К 8/67, А61К 8/97, А61К 8/9706, А61К 8/23, А61К 8/27, А61Q 19/08. Косметическая маска-пленка / Наумова Н.В., Еникеева А.В., Прищенко А.В., Таргонская О.В., Таргонский С.Н., Шарафаненко О.В.; заявитель и патентообладатель Таргонский С.Н. – №2018145902; заявл. 21.12.2018; опубл. 14.10.2019, Бюл. № 29. – 30 с.

АВТОРЫ

Кищенко Виктория Михайловна – аспирант кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала федерального бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-6947-7662. E-mail: viktoriya.kishchenko@yandex.ru

Верниковский Владислав Владиславович – кандидат биологических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала федерального бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-0324-1999. E-mail: vv.vernikovsky@mail.ru

Привалов Игорь Михайлович – кандидат био-

логических наук, доцент кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала федерального бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0001-9797-4060. E-mail: igor.privacy@gmail.com

Шевченко Александр Михайлович – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии Пятигорского медико-фармацевтического института-филиала федерального бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0002-7541-2558. E-mail: nplfarmak-50@ya.ru

УДК 615.322



ХИМИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ *GEUM RIVALE* L. И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Орлова А.А., Повыдыш М.Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14, лит. А

E-mail: anastasiya.lebedkova@spcpcu.ru

Получено 25.02.2020

Рецензия (1) 30.04.2020

Рецензия (2) 10.05.2020

Принята к печати 15.05.2020

Целью исследования является обзор данных литературы о составе биологически активных веществ надземных и подземных органов гравилата речного (*Geum rivale* L.) и фармакологической активности его извлечений и индивидуальных соединений.

Материалы и методы. Исследование проводили с использованием Интернет-ресурсов (Google Scholar, PubMed) и библиотечных баз данных (e-Library, Scopus, Web of Science). Основными методами исследования являлись обзор и анализ литературных данных по тематике исследования за период с 1958 года по настоящее время.

Результаты. В период с 1958 года по настоящее время в надземных и подземных частях гравилата речного идентифицировано более 80 компонентов в составе эфирного масла, ряд фенольных кислот и кумаринов, агликоны флавоноидов, в том числе лютеолин, апигенин, кверцетин и кемпферол, а также ряд их гликозидов и глюкуронидов, эллаготанины (гемин А, В, С, D, педункулагин, стахиурин/казуаринин, теллимаграндин I). Изучены некоторые аспекты фармакологической активности суммарных извлечений и индивидуальных вторичных метаболитов гравилата речного, экспериментально подтверждены противовоспалительная, антиоксидантная, противомикробная, противовирусная активности.

Заключение. Анализ литературных данных показал, что дальнейшее изучение состава метаболитов гравилата речного и их фармакологической активности является актуальной задачей, решение которой позволит расширить спектр использования данного растения в медицинской практике и рассматривать гравилат речной как перспективный источник фармацевтических субстанций для создания новых лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище.

Ключевые слова: гравилат речной, *Geum rivale* L., фенольные соединения, эфирные масла, танины, фармакологическая активность

CHEMICAL CONSTITUENTS OF *GEUM RIVALE* L. AND THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

Orlova A.A., Povydysh M.N.

St. Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University
14 lit. A, Professor Popov St., St. Petersburg, Russia, 197022

E-mail: anastasiya.lebedkova@spcpcu.ru

Received 25 February 2020

Review (1) 30 April 2020

Review (2) 10 May 2020

Accepted 15 May 2020

Для цитирования: Орлова А.А., Повыдыш М.Н. Химические компоненты *Geum rivale* L. и их биологическая активность. *Фармация и фармакология*. 2020;8(2):133-146. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-133-146

© Орлова А.А., Повыдыш М.Н., 2020

For citation: Orlova A.A., Povydysh M.N. Chemical constituents of *Geum rivale* L. and their biological activity. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(2):133-146. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-133-146

The aim of the study is to review the literature data on the chemical constituents of arial and underground parts of *Geum rivale* L. (*Rosaceae*) and the pharmacological activity of its extracts and individual compounds.

Materials and methods. The study was carried out using Internet resources (Google Scholar, PubMed) and library databases (e-Library, Scopus, Web of Science). The main research methods were a review and analysis of the literature data on the topic for the period from 1958 up to the present.

Results. For the period from 1958 up to the present more than 80 components in the arial and underground parts of *G. rivale* have been identified. Among them there were components of the essential oil, phenolic acids and coumarins, aglycones of flavonoids, including luteolin, apigenin, quercetin and kaempferol, as well as a number of their glycosides and glucuronides, ellagitannins (hemin A, B, C, D, pedunculagin, stachiurin/casuarinin, tellimagrandin I). Some aspects of the pharmacological activity of total extracts and individual secondary metabolites of *G. rivale* have been studied, anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, antiviral activities have been experimentally confirmed.

Conclusion. The analysis of the literature data showed that a further study of the composition of metabolites of *G. rivale* and their pharmacological activity is an urgent task, the solution of which will expand the range of use of this plant in medical practice and consider *G. rivale* as a promising source of pharmaceutical substances for the creation of new drugs and biologically active additives.

Keywords: river gravilat, *Geum rivale* L., phenolic compounds, essential oils, tannins, pharmacological activity

ВВЕДЕНИЕ

Род *Geum* L. (*Rosaceae*) представлен 58 видами [1], около 20 из которых произрастают на территории Российской Федерации [2–5]. Гравилат речной (*Geum rivale* L.) – многолетнее травянистое растение, ареал распространения которого включает большую часть Европы до Уральских гор, за исключением запада Франции, Испании и средиземноморского региона, а также Западную Сибирь, Центральную Азию, некоторые регионы Северной Америки [6, 7].

Гравилат речной широко применяется в народной медицине в качестве средства для профилактики и лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, в том числе потери аппетита и диареи, малярии [8], при лихорадочных заболеваниях, болях в мышцах, геморрое, при воспалительных заболеваниях слизистых оболочек и кожных покровов, в качестве антисептического и вяжущего средства [9, 10]. В гомеопатии применяется при воспалительных заболеваниях мочевого пузыря и мочевыводящих путей, а также при артрите [9, 11, 12].

На сегодняшний день проведен ряд исследований по изучению качественного и количественного состава биологически активных веществ в надземных и подземных частях гравилата речного, а также экспериментально выявлены некоторые аспекты фармакологической активности извлечений и отдельных групп биологически активных веществ.

Изучение широко распространенных растений в качестве источников фармацевтических субстанций для производства лекарственных препаратов и биологически активных добавок к пище является актуальной задачей, так как они показывают высокую эффективность наряду с низкой токсичностью и редкостью развития аллергических реакций.

Исходя из этого, целью исследования являлся обзор данных литературы о составе биологически активных веществ надземных и подземных органов гравилата речного (*Geum rivale* L.) и фармакологической активности его извлечений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источников информации использовали Интернет-ресурсы (Google Scholar, PubMed) и библиотечные базы данных (e-Library, Scopus, Web of Science). Основными методами исследования являлись обзор и анализ литературных данных по тематике исследования за период с 1958 года по настоящее время.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день получено достаточно много данных о различных группах вторичных метаболитов, содержащихся в надземной и подземной частях гравилата речного. Так, с использованием метода газовой хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС), достаточно подробно изучен компонентный состав эфирного масла [13, 14]. Эфирное масло в экспериментах выделяли из различных частей растения методом гидродистилляции. Разделение компонентов сложной смеси эфирного масла проводили методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (ГХ-ПИД). Идентификация компонентов базировалась на сравнении масс-спектров компонентов эфирного масла с масс-спектрами коммерческих библиотек. Идентификация изомеров базировалась на сравнении фактора удерживания (RI) с литературными данными. В ходе эксперимента в образцах эфирного масла надземной и подземной частей гравилата речного обнаружено более 80 компонентов (соединения 51–143 в таблице 1). Доминирующими компонентами в эфирном масле гравилата речного являются 3-октен-1-ол (33,9%) и 3-гексенол (16,2%). Кроме того, в эфирном масле содержится большое количество сесквитерпеноидов (32 соединения), обнаружено некоторое количество монотерпеноидов [14]. Vollmann, C. et al. (1995) провели сравнительный анализ качественного и количественного состава эфирного масла различных видов рода *Geum* L. В результате эксперимента все виды рода были раз-

делены на 2 большие группы: первая группа – виды, содержащие высокий процент эвгенола (66-92%) и с низким содержанием производных пинена – *G. urbanum*, *G. fauriei* Levl. and *G. macrophyllum* Willd.; вторая группа – виды с высоким содержанием производных пинена и низким содержанием эвгенола (0,3–4,1%) – *G. rivale* L., *G. rhodopeum* Stoj. et Stefanov, *G. bulgaricum* Pancic, *G. borisii* Kellerer ex Siindermann и *G. chiloense* Balb. [13].

Panizzi, L. et al. (2000) провели анализ состава тритерпеноидов в надземной части гравилата речного в извлечениях, полученных путем экстракции сырья в аппарате Сокслета н-гексаном, хлороформом и спирто-хлороформной смесью (1:9). Выделение интересующих соединений в чистом виде проводилось последовательной очисткой на сефадексе, силикагеле, методом тонкослойной хроматографии и обратно-фазовой хроматографии. Подтверждение структуры проводили с использованием ИК- и УФ-спектроскопии, а также методами ^1H и ^{13}C ЯМР. Выявленные в ходе исследования соединения представлены на рис. 1 и в таблице 1 под номерами 1-10. [15, 16].

Наиболее обширно представленной группой вторичных метаболитов в надземных и подземных частях гравилата речного являются полифенольные соединения. Получение извлечений с использованием экстрагентов различной полярности дает возможность изучить качественный и количественный состав полифенольных соединений. Анализ фенольных кислот и кумаринов основан на получении извлечений метанол-хлороформной смесью [15, 16, 18], петролейным эфиром [17] и бутанолом [22]. Посредством методов ИК-спектроскопии, и ^1H - и ^{13}C -ЯМР, ВЭЖХ-УФ в сравнении со стандартными образцами, ГХ-МС был определен их компонентный состав в надземной и подземной частях гравилата речного. Соединения, идентифицированные в работе нескольких научных групп, представлены на рис. 2 и в таблице 1 под номерами 11-26 (Рис. 2). По оценкам Owczarek A. et al. (2013) содержание фенольных кислот в надземной части составляет 5,9 мг/г, а в подземной части – 18,9 мг/г [17]. Кроме того, в работе Owczarek A. et al. (2014) определено содержание свободной эллаговой кислоты в надземной (0,52±0,01 мг/г) и в подземной (0,43±0,002 мг/г) частях гравилата речного [20].

Panizzi, L. et al. (2000) также провели обширную работу по изучению состава флавоноидов надземной части *G. rivale* L. Экстрагирование данной группы соединений проводили из предварительно обработанного н-гексаном, хлороформом и хлороформ-метанольной (9:1) смесью растительного материала методом мацерации метанолом при комнатной температуре с последующей очисткой на сефадексе и силикагеле и разделением на колонке с обратной фазой C18. В ходе исследования было изолировано 13 соединения, структура которых установлена метода-

ми ИК- и УФ-спектроскопии, ^1H и ^{13}C ЯМР (рис. 3, табл. 1) [16]. В работе Owczarek A. et al. (2013) проведена оценка количественного содержания флавоноидов по методу, описанному в Польской Фармакопее VIII издания: в подземной части – 0,3 мг/г; в надземной части – 3,0 мг/г [17].

Большой интерес представляет еще одна группа полифенольных соединений – танины. Основные методы анализа данной группы и экспериментальные данные по фармакологической активности описаны в опубликованном нами ранее обзоре [21]. Moilanen, J. et al. (2008, 2015) методом ВЭЖХ-МС (ионизация методом электроспрея) изучили состав эллаготанинов гравилата речного в извлечениях, полученных путем экстракции сырья 70% ацетоном с добавлением 0,1% аскорбиновой кислоты (44-50) [22, 23]. В работе Owczarek, A. et al. (2014) определено содержание галловой и эллаговой кислот после гидролиза танинов 25% раствором хлористоводородной кислоты: эллаговой кислоты – 40,31±1,08 мг/г в надземной части, 60,64±0,87 мг/г в подземной части; галловой кислоты – 7,45±0,08 мг/г в надземной части и 9,57±0,27 мг/г в подземной части (в пересчете на сухой растительный материал), из чего авторы делают вывод о большей распространенности эллаготанинов в сравнении с галлотанинами, как в надземной, так и в подземной частях исследуемого вида [20].

Owczarek, A. et al. (2017) изучили редкие сульфированные производные эллаговой кислоты, полученные путем осаждения из водного извлечения кипящим метанолом. Методами УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии и ^1H - и ^{13}C -ЯМР установлены следующие структуры: 3,3'-диметокси-4-сульфоксиэллаговой кислоты калиевая соль (29) и 3,3',4'-триметокси-4-сульфоксиэллаговой кислоты калиевая соль (30) (Рис. 4) [25].

Фармакологическая активность извлечений и индивидуальных соединений гравилата речного

Одновременно с изучением компонентного состава вторичных метаболитов в надземных и подземных частях гравилата речного, были проведены обширные исследования фармакологической активности суммарных извлечений, полученных с использованием растворителей различной полярности, а также индивидуальных метаболитов. Так, Tunon, H. et al. (1995) провели исследование противовоспалительной активности суммарного водного извлечения из надземной части гравилата речного, полученного путем двухступенчатой экстракции при комнатной температуре, в тестах влияния на синтез простагландина и PAF-индуцированного экзоцитоза. Извлечение показало высокую ингибирующую активность в PAF-тесте, при этом ингибирующего влияния на биосинтез простагландинов не выявлено [27]. Кроме того, об использовании в традиционной медицин-

ской практике извлечений из гравилата речного в качестве противовоспалительного средства сообщается в работах Birnesser, H. et al. и Parimala D. et al. [28, 29].

Owczarek, A.etal. (2015) исследовали антиоксидантную активность извлечений из надземных и подземных частей гравилата речного, полученных путем жидкостной экстракции метанольной вытяжки растворителями различной полярности, с использованием следующих тестов: DPPH-тест по методу Бранд-Уильямса, Кювье и Берсета [31] с описанными ранее модификациями [32], FRAP-тест, описанный в работе Pulido et al. [33] с некоторыми модификациями [34], тест на перекисное окисление линолевой кислоты по модифицированному методу Azumaetal. [32, 35]. Проведенное исследование показало, что корневища гравилата речного обладают высоким антиоксидантным потенциалом, который,

как полагают авторы, обеспечивают полифенольные соединения путем переноса атома водорода в ходе реакции (НАТ-механизм) [30].

Oszmianski, J. et al. (2007), в свою очередь, провели скрининг антиоксидантной активности танинов корней гравилата речного. В ходе исследования провели **тиолиз проантоцианидинов по методу, описанному Guyot, S. et al. (2001) [37], обратнoфазовую ВЭЖХ после тиoлиза**, определили содержание **проантоцианидинов (10,5 г/кг) и фенольных соединений (3,0 г/кг) в растительном материале**, а также степень полимеризации **проантоцианидинов – 3**. Для скрининга антиоксидантной активности использовали два метода: DPPH-тест по методу Yen, G. et al. (1995) [38] и ABTS-тест по методу Re, R. et al. (1999) [39]. Данное исследование продемонстрировало значительный антиоксидантный потенциал извлечения, содержащего фенольные соединения [36].

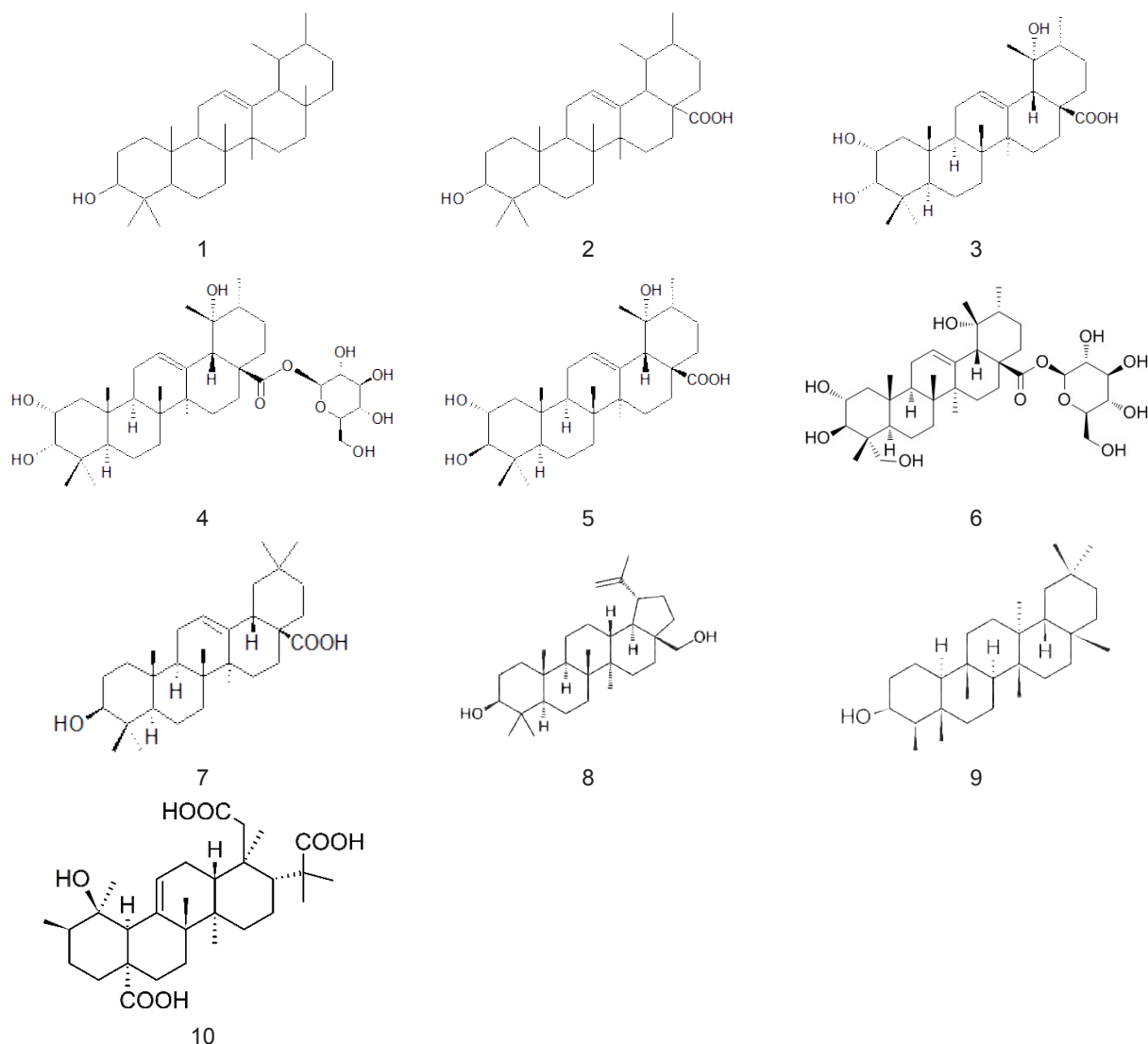
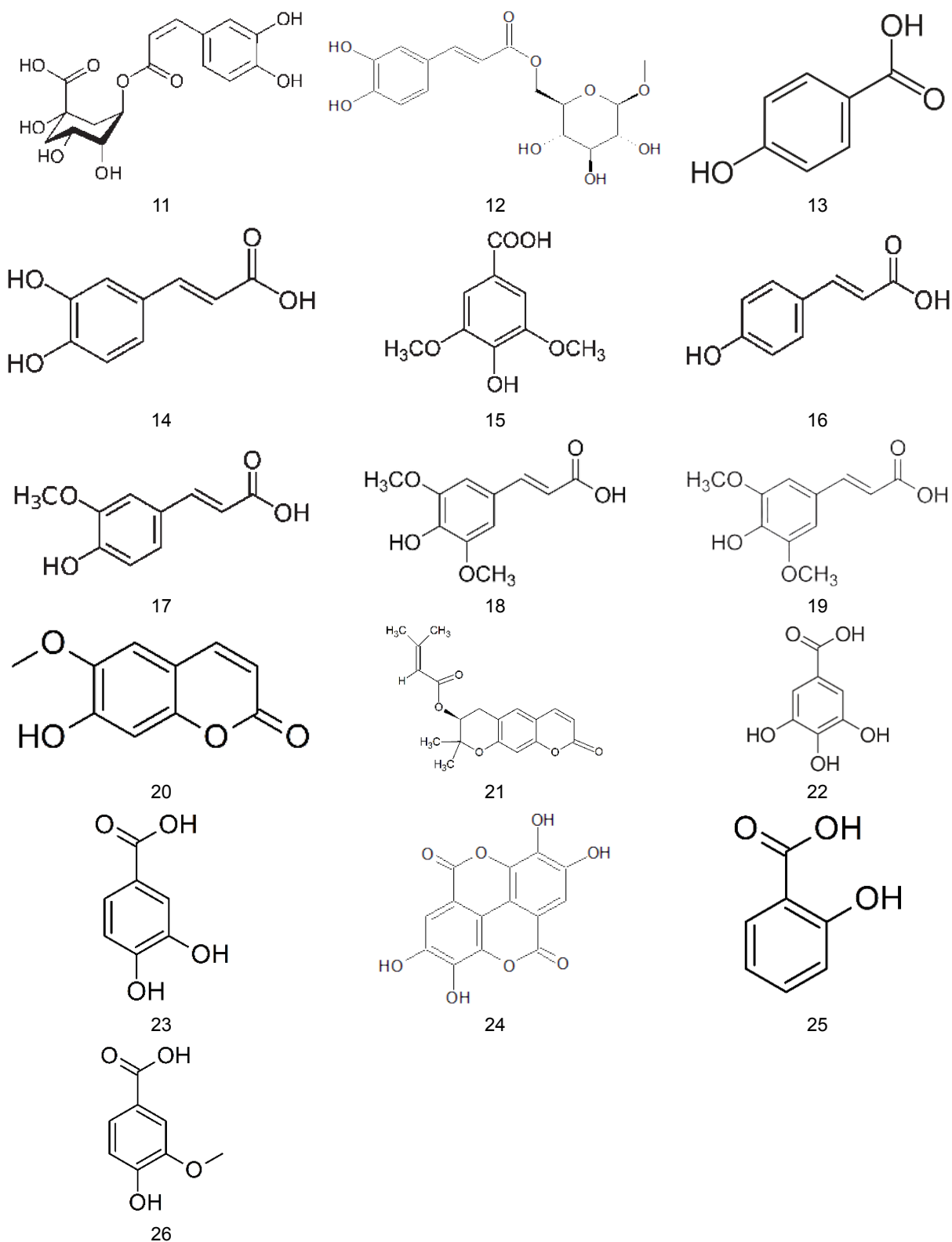


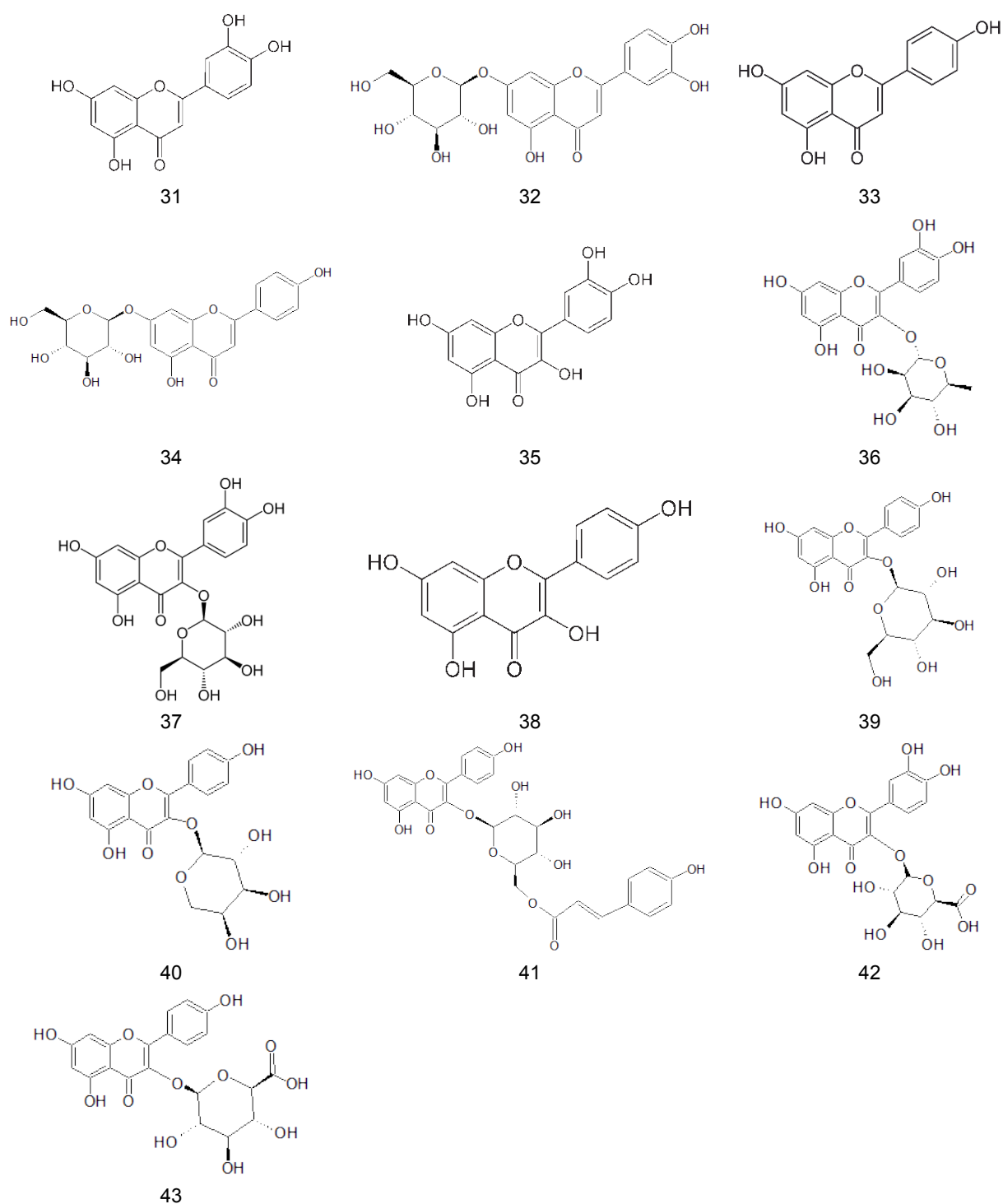
Рисунок 1 – Тритерпеноиды надземной части гравилата речного (Panizzi, L. et al., (2000))

Примечание: на рисунке представлены: 1 – α-амирин; 2 – урсоловая кислота; 3 – эускафиевая кислота; 4 – эускафиевой кислоты 28-глюкозид; 5 – торментовая кислота; 6 – нигаишигозид F1; 7 – олеановая кислота; 8 – бетулин; 9 – эпифриделлонол; 10 – цескропиевая кислота.



**Рисунок 2 – Фенольные кислоты и кумарины гравилата речного
(Panizzi, L. et al. (2000), Owczarek A. et al. (2013))**

Примечание: На рисунке представлены: 11 – хлорогеновая кислота; 12 – 6-О-кофеил-1-О-метил-β-D-глюкопираноза; 13 – п-гидроксibenзойная кислота; 14 – кофейная кислота; 15 – сиреневая кислота; 16 – п-кумаровая кислота; 17 – феруловая кислота; 18 – синаповая кислота; 19 – скополетин; 20 – эскулетин; 21 – декурсин; 22 – галловая кислота; 23 – протокатеховая кислота; 24 – эллаговая кислота; 25 – салициловая кислота; 26 – ванилин.

**Рисунок 3 – Флавоноиды гравилата речного (Panizzi, L. et al. (2000))**

Примечание: На рисунке представлены: 31 – лутеолин; 32 – лутеолин-7-О-глюкозид; 33 – апигенин; 34 – апигенин-7-О-глюкозид; 35 – кверцетин; 36 – кверцетин-3-О-рамнозид; 37 – кверцетин-3-О-глюкозид; 38 – кемпферол; 39 – кемпферол-3-О-глюкозид; 40 – кемпферол-3-О-арабинозид; 41 – тилирозид; 42 – кверцетин-3-О-глюкуронид; 43 – кемпферол-3-О-глюкуронид.

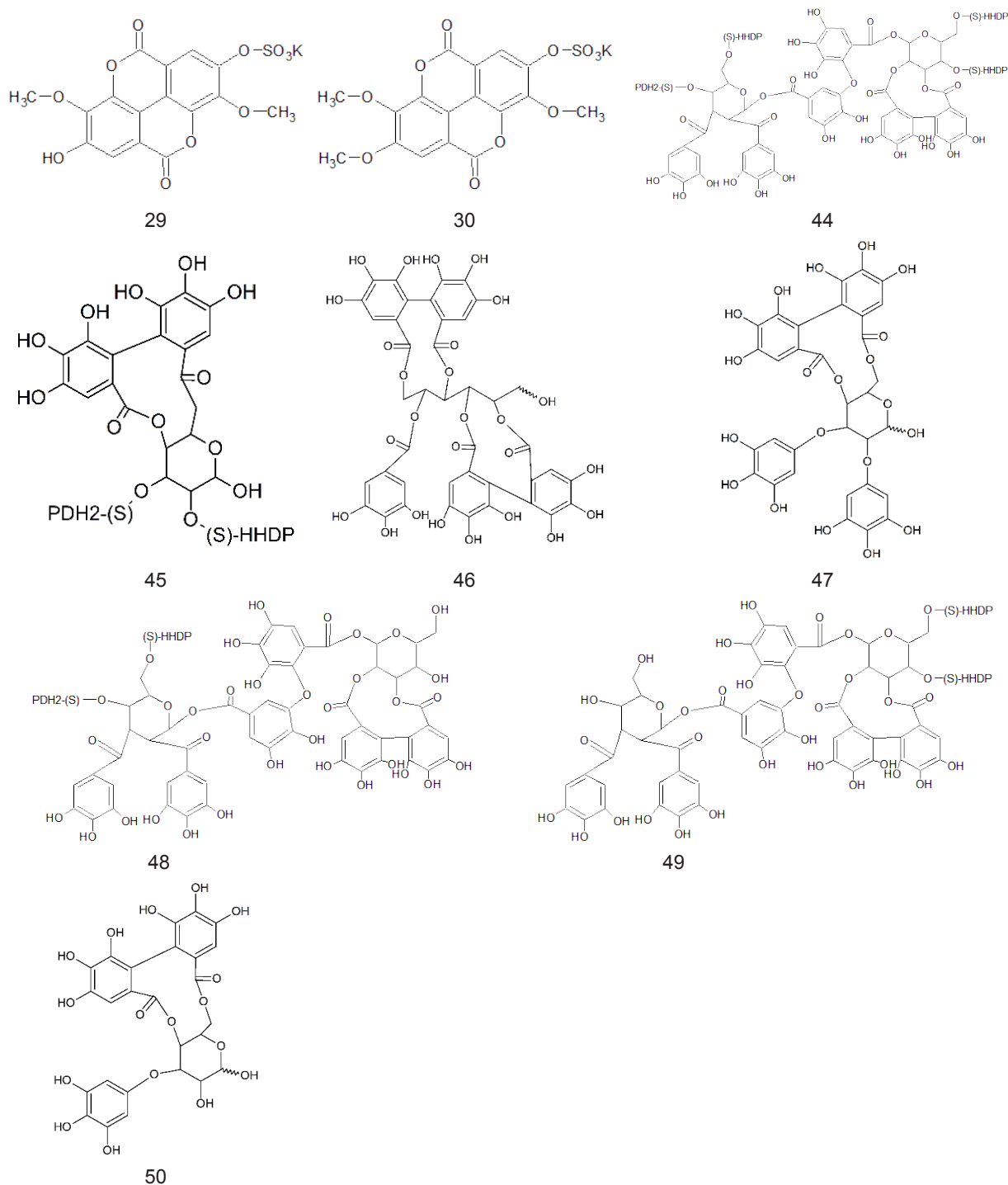


Рисунок 4 – Эллаготанины гравилата речного (Moilanen, J. et al. (2008, 2015), Owczarek, A. et al. (2017))

Примечание: На рисунке представлены: 29 – 3,3'-диметокси-4-сульфоксиэллаговой кислоты калиевая соль; 30 – 3,3',4'-триметокси-4-сульфоксиэллаговой кислоты калиевая соль; 44 – гемин А; 45 – педункулагин; 46 – стахиурин/казуаринин; 47 – теллимаграндин 1; 48 – гемин В; 49 – гемин С; 50 – гемин D.

Таблица 1 – Биологически активные соединения гравилата речного

№ п/п	Название соединения	Часть растения	Литературная ссылка
Тритерпеноиды (Урсаны)			
1	α-амирин	Надземная	15, 16
2	Урсоловая кислота		
3	Эускафиевая кислота		
4	Эускафиевой кислоты 28-глюкозид		
5	Торментовая кислота		
6	Нигаишигозид F1		
Другие тритерпеноиды			
7	Олеаноловая кислота	Надземная	15, 16
8	Бетулин		
9	Эпифриделонол		
10	Цескропиевая кислота		
Фенилпропаноиды			
11	Хлорогеновая кислота	Надземная и подземная	15, 16, 18, 46
12	6-О-кофеил-1-О-метил-β-D-глюкопираноза		15, 16, 24, 26
13	п-гидроксibenзойная кислота		17
14	Кофейная кислота	Надземная	15, 16, 18, 46
15	Сиреневая кислота	Надземная и подземная	18, 19
16	п-кумаровая кислота	Надземная	17, 46
17	Феруловая кислота	Надземная и подземная	17, 18
18	Синаповая кислота		17, 18
19	Скополетин		15, 16, 17
20	Эскулетин		
21	Декурсин		
Другие			
22	Галловая кислота	Надземная и подземная	15, 16, 17, 20, 26, 46
23	Протокатеховая кислота		15, 16, 17
24	Эллаговая кислота		15, 16, 17, 20, 46
25	Салициловая кислота		15, 16, 17
26	Ванилин	Надземная	15, 17
27	1-О-протокатехиоилглюкоза	Надземная	22
28	Сахароза	Надземная	
29	3,3'-диметокси-4-сульфоксиэллаговой кислоты калиевая соль	Подземная	
30	3,3',4'-триметокси-4-сульфоксиэллаговой кислоты калиевая соль		
Флавоноиды			
31	Лютеолин	Надземная	15, 16
32	Лютеолин 7-О-глюкозид		
33	Апигенин		
34	Апигенин 7-О-глюкозид		
35	Кверцетин		
36	Кверцетин 3-О-рамнозид		
37	Кверцетин 3-О-глюкозид		
38	Кемпферол		
39	Кемпферол 3-О-глюкозид		
40	Кемпферол 3-О-арабинозид		
41	Тилирозид		
42	Кверцетин 3-О-глюкуронид		
43	Кемпферол 3-О- глюкуронид		
Эллаготанины			
44	Гемин А	Надземная	22, 23
45	Педункулагин		23
46	Стахиурин/казуаринин		
47	Теллимаграндин 1		
48	Гемин В		
49	Гемин С		
50	Гемин D		

№ п/п	Название соединения	Часть растения	Литературная ссылка
Компоненты эфирного масла			
51	(E)-2-гексеналь	Надземная	13, 14
52	(Z),(E)-3-гексен-1-ол		
53	Гексанол		
54	Гептанол		
55	6-метил-5-гептен-2-ол		
56	(Z)-3-гексенил ацетат		
57	α -фелландрен		
58	β -фелландрен		
59	(E)- β -оцимен		
60	(E)-2-октен-1-ол		
61	Октанол		
62	Терпинолен		
63	Нонаналь		
64	Нонанол		
65	Терпинен-4-ол		
66	Деканаль		
67	β -циклоцитраль		
68	Додекан		
69	(Z)-3-гексенил-2-метилбутаноат		
70	(Z)-3-гексенил изовалерат		
71	Тридекан		
72	(Z)-3-гексенил тиглат		
73	δ -элемен		
74	α -кубебен		
75	β -дамасценон		
76	α -иланген		
77	β -бурбонен		
78	β -кубебен		
79	β -кариофиллен		
80	β -копен		
81	α -хумулен		
82	Аллоаромадендрен		
83	β -ионон		
84	γ -мууролен		
85	Гермакрин D		
86	(Z, E)- α -фарнезен		
87	α -мууролен		
88	(E, E)- α -фарнезен		
89	γ -кадинен		
90	α -калакорен		
91	Транс-неролидол		
92	(Z)-3-гексенил бензоат		
93	Кариофиллен оксид		
94	Виридифлорол		
95	Хумулен эпоксид II		
96	Фарнезен эпоксид		
97	Кубенол		
98	T-мууролол		
99	α -кадинол		
100	Пентадеканаль		
101	Гептадекан		
102	Бензил бензоат		
103	Октадекан		
104	Фитол		
105	Трикозан		
106	Тетракозан		
107	Гексакозан		
108	(Z)-гексенил бутират		

№ п/п	Название соединения	Часть растения	Литературная ссылка
109	1-зопропилциклогекс-1-ен	Подземная	13, 14
110	Транс-линалоол оксид		
111	Транс-миртаналь		
112	Пальмитиновая кислота		
113	Окт-1-ен-ол		
114	α-гвайен		
115	Куминовый альдегид		
116	Нерол		
117	транс-анетол		
118	Гераниол		
119	2-метокси-6-винилфенол		
120	Изоэвгенол		
121	Эвгенол		
122	Перилловый альдегид		
123	Фелландраль		
124	Перилловый спирт		
125	Миртеналь		
126	транс-пинокарвеол	Надземная и подземная	13, 14
127	Камфен		
128	1-октен-3-ол		
129	3-октанол		
130	Лимонен		
131	Цис-линалоол оксид		
132	Камфора		
133	Цитронеллол		
134	п-цимол		
135	δ-кадинен		
136	α-копен		
137	цис-миртанол		
138	транс-миртанол		
139	α-терпинеол		
140	Миртенол		
141	Линалоол		
142	Нопион		
143	цис-миртаналь		

Таблица 2 – Фармакологические эффекты основных групп биологически активных соединений гавилата речного

Фармакологический эффект	Вид извлечения или группа БАВ	Литературная ссылка
Противовоспалительная активность за счет PAF-индуцированного экзоцитоза	Суммарное водное извлечение	27, 28, 29
Антиоксидантная активность (DPPH-, FRAP-тесты, тест на перикисное окисление линолевой кислоты)	Полифенольные соединения	30
Антиоксидантная активность (DPPH- и ABTS-тесты)	Фенольные кислоты и проантоцианидины	36
Антимикробная активность:		
а) антимикробная активность относительно грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов	Суммарные полярные извлечения, тритерпеновая фракция, флавоноидная фракция, таниновая фракция, урсоловая кислота, кофейная кислота	15, 16, 41
б) антифунгальная активность	Суммарные полярные извлечения, тритерпеновая фракция, кофейная кислота	
в) <i>Candida albicans</i>	Хлороформное извлечение, суммарные полярные извлечения тритерпеновая фракция, кофейная кислота	
г) <i>Staphilococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Тритерпеновая фракция, кверцетин, кемпферол, кофейная кислота, галловая кислота	43
Противовирусная активность (вирус гриппа типов А и В)	Этанольные извлечения из надземной части	

Panizzi, L. et al. (2000) исследовали антимикробный потенциал извлечений различной полярности и некоторых индивидуальных соединений, полученных из надземной части гравилата речного. Высушенное сырье экстрагировали в аппарате Сокслета н-гексаном, хлороформом, смесью хлороформ-метанол 9:1, а затем методом мацерации метанолом при комнатной температуре. Далее проводили очистку полученных суммарных извлечений методом колонной хроматографии до индивидуальных соединений, идентификацию которых проводили методами ИК- и УФ-спектроскопии, ^1H - и ^{13}C -ЯМР. Все исследуемые фракции растворяли в ДМСО и проводили скрининг антимикробной активности методом диффузии в агар, описанным Clark, et al. (1981), с использованием тестовых микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* и *Aspergillus niger* [40]. В ходе исследования показано, что суммарное метанольное извлечение обладает высокой противомикробной и противогрибковой активностью, в то время как н-гексановое извлечение показало слабую активность относительно бактерий и *Aspergillus niger*, хлороформное извлечение имело выраженную активность против *Candida albicans*, а хлороформ-метанольные и водно-метанольные извлечения оказались активны против всех исследуемых организмов. При анализе очищенных извлечений и индивидуальных соединений получены следующие результаты: три-терпеновая фракция показала эффективность, сравнимую с метанольным и хлороформ-метанольным извлечениями, против всех исследуемых микроорганизмов; сумма флавоноидов оказалась активна против грамм-положительных и грамм-отрицательных бактерий при отсутствии антифунгальной активности; таниновая фракция оказалась активна только по отношению к бактериям, но ее эффективность была ниже, чем у флавоноидной фракции; урсоловая кислота имела зоны подавления очень похожие на полученные с использованием хлороформ-метанольного экстракта при отсутствии антифунгального эффекта; среди флавоноидных агликонов кемпферол и кверцетин действовали только на *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* соответственно, в то же время у апигенина противомикробной и антифунгальной активности не выявлено; кофейная кислота проявила средне выраженную противомикробную активность на все тестовые организмы, тогда как галловая кислота показала выраженную эффективность против *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans* [16].

Выявление природных метаболитов и синтетических средств, эффективных в профилактике и лечении заболеваний, вызванных вирусами гриппа различных типов, является актуальной проблемой последнего десятилетия. Исследователи предполагают, что суммарные нативные комплексы метаболитов, а также

индивидуальные природные соединения различной природы, такие как полифенолы, тритерпеноиды, алкалоиды, органические кислоты и некоторые другие, могут применяться в качестве средств ингибирования инфекций на различных стадиях [42]. Поэтому в работе Лобанова, И.Е. и др. (2016) рассмотрена противовирусная активность 70 видов растений, относящихся к 14 различным семействам, и в том числе надземной части гравилата речного. Исследование проводилось с использованием этанольных извлечений, полученных по методу, описанному в работе Костиной, Н.И. и др. (2013) [44], вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1) и адаптированный к лабораторным мышам штамм вируса гриппа человека A/Aichi/2/68 (H3N2), титр которых рассчитывали по методу Спирмена-Кербера с использованием статистической обработки по Заксу, Л. (1976) [45]. В ходе проведенных исследований выявлено, что этанольное извлечение из надземной части гравилата речного обладает выраженной противовирусной активностью против обоих исследуемых вирусных штаммов и может быть рекомендовано для дальнейших исследований в данной области с целью создания фитопрепаратов для профилактики и лечения гриппа, вызванного указанными штаммами вируса [43].

Эллаговая кислота – метаболит высших растений, который содержится в достаточно больших количествах в надземных и подземных частях гравилата речного как в свободном, так и в связанном виде в составе эллаготанинов. Благодаря широкому распространению, возможности применения данного соединения в медицинской практике хорошо изучены. Так, García-Niño, W.R. et al. (2015) впервые провели систематический обзор литературы и подробно описали возможные фармакологические эффекты эллаговой кислоты [47]: выявлены антимутогенная [48], антигенотоксическая [49, 50], антиапоптолическая [51], антиканцерогенная [52], антибактериальная [53], противовирусная [54], противомаларийная [55], противоаллергическая [56], противовоспалительная [57], антиатерогенная [58], противодиабетическая [59], противоэпилептическая [60], антидепрессантная [61], антиноцицептивная [62], нейропротекторная [63], нефропротекторная [64], кардиопротекторная [65] и гепатопротекторная [66] активности. Однако вклад эллаговой кислоты в уже изученные фармакологические эффекты извлечений, полученных из надземных и подземных частей гравилата речного, не оценен.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных показал, что гравилат речной является объектом фитохимических исследований в течение длительного периода времени. Это связано как с богатой сырьевой базой растения, так и с широким применением в народной медицине.

За период с 1958 года по настоящее время в надземных и подземных частях гравилата речного идентифицировано более 80 компонентов. Охарактеризованы основные группы вторичных метаболитов, в том числе эфирное масло, тритерпеноиды и фенольные соединения надземной и подземной частей гравилата речного. Наиболее обширно представленной группой вторичных метаболитов являются полифенольные соединения. Несмотря на достаточную изученность химического состава, растение не является официальным в России.

Богатый состав полифенольных соединений обуславливает характер фармакологических эффектов растения, включающих противовоспалительную, антиоксидантную, антимикробную и противовирусную активность. Экспериментально подтверждена фармакологическая активность как извлечений, полученных путем экстракции растворителями различной полярности или фракционирования, так и некоторых индивидуальных соединений. Данные виды активности могут оказаться полезными в отношении некоторых социально-значимых патологий, например, антиоксидантная активность – в профилактике и лечении заболеваний сердечно-сосудистой, мочевыделительной и нервной систем, а антимикробная и противовирусная активности – при лечении заболеваний, вызванных устойчивыми штаммами микроорганизмов и вирусов.

Однако имеющиеся на сегодняшний день данные о химическом составе и активности гравилата речного не дают общей картины потенциала исполь-

зования растения в качестве источника новых фармацевтических субстанций природного происхождения для создания лекарственных препаратов и биологически активных добавок.

Современный уровень развития аналитических методов в фитохимии диктует необходимость разработки методов выделения индивидуальных природных соединений и установления их точной структуры с использованием одномерной и двумерной спектроскопии ядерного магнитного резонанса и инфракрасной спектроскопии с дальнейшим изучением их фармакологического потенциала, чего на данный момент в отношении гравилата речного не проводилось. Поэтому целесообразно продолжить изучение состава вторичных метаболитов надземной и подземной частей данного растения с использованием современных методов анализа, для выявления ранее не обнаруженных, а также новых для науки природных соединений. Выявление конкретных соединений, ответственных за развитие ценных для медицины видов биологической активности с использованием методов *in silico*, анализ возможных синергетических или аддитивных эффектов комбинаций вторичных метаболитов, а также предсказание механизмов, связанных с проявлением определенного эффекта, может стать перспективным направлением для дальнейшего изучения гравилата речного на современном уровне. Полученные данные дадут возможность расширить спектр использования гравилата речного в медицине.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо 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. Цвелев Н.Н. Флора Восточной Европы / Н.Н. Цвелев // Том X. СПб.: Мир и семья. Изд. СПХФА. -2001. – С. 460–466.
2. Губанов И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.С. Тихомиров // Т. 2. М.: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований. – 2003. – 190 с.
3. Маевский П.Ф. Флора средней полосы европейской части России / П.Ф. Маевский // 10-е изд. М.: Товарищество научных изданий КМК – 2006. – С. 379–400.
4. Еленевский А.Г. Растения Белгородской области (конспект флоры) А.Г. Еленевский, В.И. Радыгина, Н.Н. Чадаева // М. – 2004. – 120 с.
5. Лазарев, А.В. Род *Geum* в современных экологических условиях средней России / А.В. Лазарев, Т.В. Бурченко // Научные ведомости. – 2009. – № 3 (58). – С. 34–38.
6. Hulten E. The Amphi-Atlantic Plants and their Phytogeographical Connections / E. Hulten // Kongl. Svenska Vetens. – Akad. Handl. – 1958. – 4 ser. – № 7 (1). – P. 1–340.
7. Taylor K. *Geum rivale* L. / K. Taylor // Journal of Ecology. – 1997. – V. 85, №5. – P. 721–731.
8. Hulten L. The first Finnish malariologist, Johan Haartman, and the discussion about malaria in 18th century Turku, Finland / L. Hulten // Malaria Journal. – 2011. – № 10, 43. DOI:10.1186/1475-2875-10-43
9. Thomson Healthcare / Physicians' desk reference for herbal medicines 4th ed. H. Thomson // Montvale, NJ – Thomson – 2007. – P. 71–72
10. Vollmann C. Composition of the Root Essential Oils of Several Geum Species and Related Members of the Subtribus Geinae (Rosaceae) / C. Vollmann, W. Schultze // Flavour and Fragrance Journal. -1995. – V. 10. – P. 173–178.
11. Birnesser H. The Homeopathic antiarthritic preparation Zeel comp. N: Review of Molecular and Clinical Data / H. Birnesser, P. Stolt // Explore. – 2007. – V. 3, №1. – P. 16–22. DOI: 10.1016/j.explore.2006.10.002.
12. Egoshina T.L. Medicinal plants in folk medicine of taiga zone of Russia: peculiarities of use and resources / T.L. Egoshina, E.A. Luginina // Plant, fungal and habitat diversity investigation and conservation. Proceedings of IV BBC. – 2006. – P. 624–631. DOI: 10.13140/2.1.4303.9044.
13. Vollmann C. Composition of the Root Essential Oils of

- Several Geum Species and Related Members of the Subtribus Geinae (Rosaceae) / C. Vollmann, W. Schultze // *Flavour and Fragrance Journal*. – 1995. – V. 10. – P. 173–178.
14. Owczarek A. Composition of Essential Oil from Aerial and Underground Parts of *Geum rivale* and *G. urbanum* Growing in Poland / A. Owczarek, J. Gudej, A. Kicel // *Natural Product Communications*. – 2013. – V. 8, №4. – P. 505–508. DOI: 10.1177/1934578X1300800425.
 15. Cheng X.R. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Geum* / X.R. Cheng, H.Z. Jin, J.J. Qin, J.J. Fu, W.D. Zhang // *Chemistry and biodiversity*. – 2011. – V. 8, №2. – P. 203–222. DOI: 10.1002/cbdv.200900347.
 16. Panizzi, L. In vitro Antimicrobial Activity of Extracts and Isolated Constituents of *Geum rivale* / L. Panizzi, S. Catalano, C. Miarelli, P.L. Cioni, E. Campeol // *Phytotherapy Research*. – 2000. – V. 14, №7. – P. 561–653. DOI: 10.1002/1099-1573(200011)14:7<561::AID-PTR651>3.0.CO;2-H.
 17. Owczarek A. Investigation into biological active constituents of *Geum rivale* / L. A. Owczarek, J. Gudej // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug research*. – 2013. – V. 70, №1. – P. 111–114.
 18. Морозова Е.В. Содержание и состав фенолкарбоновых кислот в *Geum rivale*, *G. urbanum* и *G. aleppicum* (Rosaceae) // Е.В. Морозова, И.И. Чемесова, Г.П. Яковлев // *Растительные ресурсы*. – 2009. – Т. 45. – №4. – С. 54–55.
 19. Полухина Т.С. Количественное определение флавоноидов в надземной части гравилата речного (*Geum rivale* L.) / Т.С. Полухина, С.Ф. Погудина, Д.Р. Инизарова // *Современные научные исследования: Актуальные вопросы, достижения и инновации. Сборник статей победителей III Международной научно-практической конференции*. Изд.: Наука и просвещение. – 2017. – С. 225–227.
 20. Owczarek A. Quantitative determination of ellagic acid and gallic acid in *Geum rivale* L. and *G. urbanum* L. / A. Owczarek, M.A. Olszewska, J. Gudej // *Acta Biologica Cracoviensis Sertes Botanica*. – 2014. – № 56/2. – P. 74–78. DOI: 10.2478/abcsb-2014-0021.
 21. Орлова А. Обзор методов качественного и количественного анализа танинов в растительном сырье / А. Орлова, М. Пovyдыш // *Химия растительного сырья*. – 2019. – №4. – С. 29–45. DOI: 10.14258/jcpm.2019045459.
 22. Moilanen J. Ecologically neglected tannins and their biologically relevant activity: chemical structures of plant ellagitannins reveal their in vitro oxidative activity at high pH / J. Moilanen, J.P. Salminen // *Chemoecology*. – 2008. – №18. – P. 73–83. DOI: 10.1007/s00049-007-0395-7.
 23. Moilanen J. Distribution and content of ellagitannins in Finnish plant species / J. Moilanen, P. Koskinen, J.P. Salminen // *Phytochemistry*. – 2015. – V. 116. – P. 188–197. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.03.002.
 24. Ming D.Sh. A new compound from *Geum rivale* L. / D.Sh. Ming, R.-W. Jiang, P.P.-H. But, G.H. N. Towers, De-Q. Yu // *Journal of Asian Natural Products Research*. – 2002. – V. 4, №3. – P. 217–220. DOI: 10.1080/10286020290024022.
 25. Owczarek A. Rare Ellagic Acid Sulphate Derivatives from the Rhizome of *Geum rivale* L.—Structure, Cytotoxicity, and Validated HPLC-PDA Assay A. Owczarek, M. Ró zalski, U. Krajewska, M.A. Olszewska // *Applied Science*. – 2017. – V. 7, №4. – 400 p. DOI: 10.3390/app7040400.
 26. Буданцев А.Л. Растительные ресурсы России. Том 2. Семейства Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae. Под ред. А.Л. Буданцева. СПб.: Товарищество научных изданий КМК. – 2009. – 513 с.
 27. Tunon H. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis / H. Tunon, C. Olavsdotter, L. Bohlin // *Journal of Ethnopharmacology*. – 1995. – V. 48, №2. – P. 61–76. DOI: 10.1016/0378-8741(95)01285-1.
 28. Birnesser H. The Homeopathic antiarthritic preparation Zeel comp. N: Review of Molecular and Clinical Data / H. Birnesser, P. Stolt // *Explore*. – 2007. – V. 3, №1. – P. 16–22. DOI: 10.1016/j.explore.2006.10.002.
 29. Parimala Devi B. Inflammation and Medicinal Plants – An Ethnomedicinal Approach / B. Parimala Devi, N. Tamilchelvan, R. Ramasubramaniraja // *Journal of Phytology*. – 2010. – V.2, №2. – P. 49–56.
 30. Owczarek A. Antioxidant activity of *Geum rivale* L. and *Geum urbanum* L. / A. Owczarek, J. Gudej, M.A. Olszewska // *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug research*. – 2015. – V. 72, № 6. – P. 1239–1244.
 31. Brand-Williams W. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity / W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset // *LWT – Food Science and Technology*. – 1995. – V. 28, №1. – P. 25–30. DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
 32. Olszewska M.A. Profiling of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Dry Extracts from the Selected *Sorbus* Species / M.A. Olszewska, A. Presler, P. Michel // *Molecules*. – 2012. – V. 17, №3. – P. 3093–3113. DOI: 10.3390/molecules17033093.
 33. Pulido R. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols as Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay / R. Pulido, L. Bravo, F. Saura-Calixto // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2000. – V. 48, №8. – P. 3396–3402. DOI: 10.1021/jf9913458.
 34. Olszewska M.A. Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three *Sorbus* species in relation to their polyphenolic composition / M.A. Olszewska, P. Michel // *Natural Product Research*. – 2009. – V. 23, №16. – P. 1507–1521. DOI: 10.1080/14786410802636177.
 35. Azuma K. Phenolic Antioxidants from the Leaves of *Corchorus olitorius* L. K. Azuma, M. Nakayama, M. Koshioka, K. Ippoushi, Y. Yamaguchi, K. Kohata, Y. Yamauchi, H. Ito, H. Higashio // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1999. – V. 47, №10. – P. 3963–3966. DOI: 10.1021/jf990347p.
 36. Oszmianski J. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots / J. Oszmianski, A. Wojdylo, E. Lamer-Zarawska, K. Swiader // *Food chemistry*. – 2007. – V. 100, №2. – P. 579–583. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.09.086.
 37. Guyot S. Direct thiolysis on crude apple materials for HPLC characterization and quantification of polyphenols in cider apple tissues and juices / S. Guyot, N. Marnet, P. Sanoner, J.F. Drilleau // *Methods in Enzymology*. – 2001. – № 335. – P. 57–70. DOI: 10.1016/S0076-6879(01)35231-X.
 38. Yen G.C. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity G.C. Yen, H.Y. Chen // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1995. – V. 43, №1. – P. 27–32. DOI: 10.1021/jf00049a007.
 39. Re R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans // *Free Radical Biology & Medicine*. – 1999. – V. 26, №9-10. – P.1231–1237. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
 40. Clark, A. M. Antimicrobial activity of phenolic constituents of *Magnolia grandiflora* L. / A.M. Clark, F.S. El-Ferali, W.S. Li // *Journal of Pharmaceutical Science*. – 1981. – V. 70, №8. – P. 951–952. DOI: 10.1002/jps.2600700833.
 41. Varaprasad B. A Search for Antibacterial Agents Edited by Varaprasad Bobbarala. Published by InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia. – 2012. – 8 p.
 42. Levina A.S. Knockdown of different influenza A virus subtypes in cell culture by a single antisense oligodeoxyribonucleotide / A.S. Levina, M.N. Repkova, N.A. Mazurkova, E.V. Makarevich, Z.R. Ismagilov, V.F. Zarytova // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2015. – V. 46, №1. – P. 125–128. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.004.
 43. Лобанова И.Е. Противовирусные свойства дикорастущих и культивируемых растений юго-западной Сибири / И.Е. Лобанова, Е.И. Филиппова, Г.И. Высочина, Н.А. Мазуркова // *Растительный мир азиатской России*. – 2016. – Т. 2. – №22. – С. 64–72.
 44. Костина Н.Е. Выделение, характеристика и противовирусные свойства биологически активных веществ из высших грибов Западной Сибири / Н.Е. Костина, Ж.Б.

- Ибрагимова, М.А. Проценко, Е.В. Макаревич, М.А. Скарнович, Е.И. Филиппова, И.А. Горбунова, В.А. Влащенко, Г.П. Трошкова, Н.А. Мазуркова, Л.Н. Шишкина // Рациональное питание, пищевые добавки и биостимуляторы. - 2014. - № 2. - С. 25–26.
45. Закс Л. Статистическое оценивание. Серия: Зарубежные статистические исследования. Перевод с немецкого. М.: Статистика. - 1976. - 598 с.
46. Козира С.А. Хімічний склад та використання в медицині рослин роду *Geum* L. (Огляд літератури) С.Акозира, М.А. Кулагіна, А.Г. Сербін // Запорозький медичний журнал. 2008. - Т. 2. - №2(47). - С. 80–82.
47. Garcia-Nino W.R. Ellagic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection / W.R. Garcia-Nino, C. Zazueta // Pharmacological Research. - 2015. №97. - P. 84–103. DOI: 10.1016/j.phrs.2015.04.008.
48. Zahin M. Punicalagin and ellagic acid demonstrate antimutagenic activity and inhibition of benzo[a]pyrene induced DNA adducts / M. Zahin, I. Ahmad, R.C. Gupta, F. Aqil // BioMed Research International. - 2014. - P. 467465. DOI: 10.1155/2014/467465,467465.
49. Rehman M.U. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of ellagic acid / M.U. Rehman, M. Tahir, F. Ali // Molecular and Cellular Biochemistry. - 2012. - V. 365 №1-2. - P. 119–127. DOI: 10.1007/s11010-012-1250-x.
50. Abraham S.K. Anti-genotoxic effects in mice after the interaction between coffee and dietary constituents / S.K. Abraham // Food Chemical Toxicology. - 1996. - V. 34. - P. 15–20. DOI: 10.1016/0278-6915(95)00085-2.
51. Khanduja K.L. Anti-apoptotic activity of caffeic acid, ellagic acid and ferulic acid in normal human peripheral blood mononuclear cells: a Bcl-2 independent mechanism / K.L. Khanduja, P.K. Avti, S. Kumar, N. Mittal, K.K. Sohi, C.M. Pathak // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. - 2006. - V. 1760, №2. - P. 283–289. DOI: 10.1016/j.bbagen.2005.12.017.
52. Li T. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells / T. Li, G. Chen, C. Su, J.-G. Lin, C. Yen, K. Cheng, J. Chung // Anticancer Research. - 2005. - V. 25, № 2A. - P. 971–979.
53. Abuelsaad A.S. Antimicrobial and immunomodulating activities of hesperidin and ellagic acid against diarrheic *Aeromonas hydrophila* in a murine model / A.S. Abuelsaad, I. Mohamed, G. Allam, A.A. Al-solumani // Life Science. - 2013. - V. 93, №20. - P. 714–722. DOI: 10.1016/j.lfs.2013.09.019.
54. Park S.W. Antiviral activity and possible mode of action of ellagic acid identified in *Lagerstroemia speciosa* leaves toward human rhinoviruses / S.W. Park, M.J. Kwon, J.Y. Yoo H.J. Choi, Y.J. Ahn // BMC Complementary and Alternative Medicine. - 2014. - №14(171). DOI: 10.1186/1472-6882-14-171.
55. Soh P.N. In vitro and in vivo properties of ellagic acid in malaria treatment / P.N. Soh, B. Witkowski, D. Olanier, M.-L. Nicolau, M.-C. Garcia-Alvares, A. Berry, F. Benoit-Vical // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2009. - V. 53, №3. - P. 1100–1106. DOI: 10.1128/AAC.01175-08.
56. Choi Y.H. Ellagic Acid attenuates immunoglobulin E-mediated allergic response in mast cells / Y.H. Choi, G.H. Yan // Biological and Pharmaceutical Bulletin. - 2009. - V. 32, №6. - P. 1118–1121. DOI: 10.1248/bpb.32.1118.
57. Promsong A. Ellagic acid modulates the expression of oral innate immune mediators: potential role in mucosal protection / A. Promsong, C. Wo, S. Satthakarn, W. Nittayananta // Journal of Oral Pathology Medicine. - 2014. - V. 44, №3. - P. 214–221. DOI: 10.1111/jop.12223.
58. Kuo M.-Y. Ellagic acid inhibits oxidized low-density lipoprotein (OxLDL)-induced metalloproteinase (MMP) expression by modulating the protein kinase C- α /extracellular signal-regulated kinase/peroxisome proliferator-activated receptor γ /nuclear factor- κ B (PKC- α /ERK/PPAR- γ /NF- κ B) Signaling Pathway in Endothelial Cells / M.-Y. Kuo, H.-C. Ou, W.-J. Lee, W.-W. Kuo, L.-L. Hwang, T.-Y. Song, C.-Y. Huang, T.-H. Chiu, K.-L. Tsai, C.-S. Tsai, W.H.-H. Sheu // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2011. - V. 59, №9. - P. 5100–5108. DOI: 10.1021/jf1041867.
59. Pinto M. da S. Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria* $\times$ *ananas* Duch.) using in vitro models / M. da S. Pinto, J.E. de Carvalho, F.M. Lajolo, M.I. Genovece, K. Shetty // Journal of Medicinal Food. - 2010. - V. 13, № 5. - P. 1027–1035. DOI: 10.1089/jmf.2009.0257.
60. Dhingra D. Antiepileptic activity of ellagic acid, a naturally occurring polyphenolic compound, in mice / D. Dhingra, A. Jangra // Journal of Functional Foods. - 2014. - V. 10. - P. 364–369. DOI: 10.1016/j.jff.2014.07.011.
61. Dhingra D. Antidepressant-like activity of ellagic acid in unstressed and acute immobilization-induced stressed mice / D. Dhingra, R. Chhillar // Pharmacological Reports. - 2012. - V. 64, №4. - P. 796–807. DOI: 10.1016/S1734-1140(12)70875-7.
62. Girish C. Involvement of the GABAergic system in the anxiolytic-like effect of the flavonoid ellagic acid in mice / C. Girish, V. Raj, J. Arya, S. Balakrishnan // European Journal of Pharmacology. - 2013. - V. 710, № 1–3. - P. 49–58. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.04.003.
63. Kwak H. β -Secretase (BACE1) inhibitors from pomegranate (*Punica granatum*) husk / H. Kwak, S. Jeon, B. Sohng, J. Kim, J. Lee, K. Lee, H. Jeong, J. Hur, Y. Kang, K. Song // Archives of Pharmacological Research. - 2005. - V. 28, №12. - P. 1328–1332. DOI: 10.1007/BF02977896.
64. El-Garhy A.M. Ellagic acid antiinflammatory and antiapoptotic potential mediate renoprotection in cisplatin nephrotoxic rats / A.M. El-Garhy, O.M. Abd El-Raouf, B.M. El-Sayeh, H.M. Fawzy, D.M. Abdallah // Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. - 2014. - V. 28, № 10. - P. 472–479. DOI: 10.1002/jbt.21587.
65. Kannan M.M. Ellagic acid inhibits cardiac arrhythmias, hypertrophy and hyperlipidaemia during myocardial infarction in rats / M.M. Kannan, S.D. Quine // Metabolism. - 2013. - V. 62, № 1. - P. 52–61. DOI: 10.1016/j.metabol.2012.06.003.
66. Lee J.H. Protective effect of ellagic acid on concanavalin A-induced hepatitis via Toll-like receptor and mitogen-activated protein kinase/nuclear factor κ B signaling pathways / J.H. Lee, J.H. Won, J.M. Choi, H.H. Cha, Y.J. Jang, S. Park, H.G. Kim, H.C. Kim, D.K. Kim // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2014. - V. 62, № 41. - P. 10110–10117. DOI: 10.1021/jf503188c.

АВТОРЫ

Орлова Анастасия Андреевна – аспирант кафедры фармакогнозии, младший научный сотрудник Отдела научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID: 0000-0002-7836-5785. E-mail: anastasiya.lebedkova@spcpcu.ru

Повыдыш Мария Николаевна – доктор биологических наук, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии, начальник Отдела научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID: 0000-0002-7768-9059. E-mail: maria.povydysh@pharminnotech.com

