

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОНИЗИРОВАННОЙ ОЧИЩЕННОЙ ФЛАВОНОИДНОЙ ФРАКЦИИ ОБЛЕПИХОВОГО ШРОТА

М.Н. Школьникова

д.т.н, доц., Бийский технологический институт (филиал)
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова» (г. Бийск, Россия);
ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет» (г. Екатеринбург, Россия)
E-mail: shkolnikova.m.n@mail.ru

Е.В. Аверьянова

к.х.н., доц., Бийский технологический институт (филиал)
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова» (г. Бийск, Россия)

Е.Д. Рожнов

д.т.н, Бийский технологический институт (филиал)
ФГБОУ ВО «Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова» (г. Бийск, Россия)

И.А. Лупанова

к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва, Россия)
E-mail: lupanova@vilarnii.ru

Актуальность. Изыскание и комплексное исследование терапевтических эффектов флавоноидов, выделенных из растительного сырья и отходов его переработки, в современных условиях приобретает важное значение. Одним из доступных сырьевых источников целесообразно рассматривать многотоннажный отход переработки плодов облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) – шрот.

Цель работы – исследовать фармакологическую активность микронизированной формы композиции биофлавоноидов обезжиренного облепихового шрота, обуславливающих флебопротекторную активность *in vitro* и *in vivo*, в сравнении с препаратом Detralex®.

Материал и методы. Микронизированную очищенную флавоноидную фракцию из обезжиренного облепихового шрота облепихи крушиновидной (МОФФ ОШ) получали экстракцией комплекса биофлавоноидов из обезжиренного шрота этиловым спиртом концентрацией 90% в аппарате Сокслета. Из экстракта под вакуумом удаляли растворитель, промывали вязкую сиропообразную массу вакуум-концентрата водой в соотношении 1:3. Осадок фильтровали и высушивали, затем проводили ультразвуковую микронизацию фракции флавоноидов в жидкой дисперсионной среде при мощности ультразвукового излучения 50 Вт. Терапевтические эффекты МОФФ ОШ изучены: *in vitro* с применением специфических ферментных биотест-систем на основе глутатион-редуктазы, каталазы и NO-синтазы – антиоксидантная и противовоспалительная активность, *in vivo* – на 30 крысах-самцах Wistar массой тела 150–270 г по показателям сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза.

Результаты. С помощью специфических ферментных биотест-систем *in vitro* выявлено, что образец МОФФ ОШ обладает антиоксидантным и противовоспалительным действием. В опытах *in vivo* установлено, что МОФФ ОШ после предварительного курсового введения в дозе 25 мг/кг вызывает частичную активацию системы гемостаза у крыс, ускоряя наступление фазы инициации свертывания крови.

Выводы. Дальнейшие исследования МОФФ ОШ имеют важное практическое значение, поскольку открывают перспективу создания новых лекарственных средств флебопротекторного действия.

Ключевые слова: облепиховый шрот, флавоноидная фракция, микронизация, терапевтический эффект.

Для цитирования: Школьникова М.Н., Аверьянова Е.В., Рожнов Е.Д., Лупанова И.А. Исследование фармакологической активности микронизированной очищенной флавоноидной фракции облепихового шрота. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(7):9–14. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-07-02>

Сложившаяся необходимость на импортозамещение лекарственных средств способствует изысканию и комплексному исследованию фармакологических свойств флавоноидов как из растительного сырья Российской Федерации, так и отходов его переработки. В этой связи облепиха круши-

новидная (*Hippophae rhamnoides* L.) представляет особый интерес, так как крупнотоннажный отход после переработки плодов – облепиховый шрот, составляющий только в Алтайском крае до 200 т/год, используется в основном как наполнитель для кормов, при получении драже и пробиотиков. Доказа-

но, в том числе собственными исследованиями, что шрот облепихи содержит значимое количество флавоноидов, обладающих широким спектром подтвержденной *in silico*, *in vitro* и *in vivo* фармакологической активностью (антиоксидантная, противовирусная, антибактериальная, противовоспалительная и др.) при отсутствии токсичности и являющихся потенциальными источниками фармацевтических субстанций [1].

Проведенный авторами аналитический обзор российских и зарубежных наукометрических баз данных (РИНЦ, Академия Google, Scopus, Web of Science и др.) свидетельствует о перспективности использования флавоноидов облепихового шрота в качестве эффективных фармацевтических субстанций, в частности флебопротекторов, так как флавоноидам плодового сырья свойственна флеботропная и вентонизирующая активность [2, 3].

На сегодня хронические заболевания вен нижних конечностей (ХЗВ), называемые болезнью цивилизации, имеют выраженный социально значимый аспект и постоянно ухудшающуюся эпидемиологическую ситуацию: ХЗВ страдает от 35 до 60% людей трудоспособного возраста, а в возрасте старше 50 лет хроническая недостаточность наблюдается у 99% населения. Клиническая картина ХЗВ имеет различные симптомы, в целом ухудшающие качество жизни пациентов [4].

Фармакотерапия ХЗВ является обязательным методом лечения и базируется на использовании флебопротекторов – большой группы направленных на улучшение работы венозной системы лекарственных препаратов, получаемых в результате переработки как растительного сырья, так и путем химического синтеза. В мировой фармакопее представлено более 100 препаратов для лечения венозной недостаточности, в Российской Федерации разрешено к применению порядка 20. При этом доминируют лекарственные препараты, созданные на базе флавоноидов и флавоноидных комплексов, и в основном диосмина и гесперидина, для повышения биодоступности которых на практике используются многочисленные технологические приемы. Доказано, что наиболее эффективным является ультразвуковая микронизация: микронизированные комплексы способствуют увеличению поверхности соприкосновения частиц с водой, за счет чего абсорбция флавоноидов в желудочно-кишечном тракте достигает 60–65%, поскольку размер частиц с 36,5 мкм (нативный компонент) уменьшается до 1,75 мкм. Таким образом,

повышение растворимости путем измельчения приводит к усилению антиоксидантной активности и капилляропротективного действия как основных терапевтических эффектов при фармакотерапии ХЗВ. В связи с этим наиболее эффективным считается Detralex® [5–7].

Ц е л ь р а б о т ы – исследование фармакологической активности микронизированной формы композиции биофлавоноидов обезжиренного облепихового шрота, обуславливающих флебопротекторную активность *in vitro* и *in vivo*, в сравнении с препаратом Detralex®.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили: микронизированная очищенная флавоноидная фракция из обезжиренного облепихового шрота (МОФФ ОШ) облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.), полученная по [8] – образец № 1; препарат сравнения Detralex® (Лаборатория Сервье, Франция), таблетки 1000 мг – образец № 2.

Исследования фармакологической активности МОФФ ОШ (антиоксидантной и противовоспалительной) выполнены в ФГБНУ ВИЛАР с применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro* на основе глутатионредуктазы (ГР), каталазы (КАТ) и NO-синтазы, входящих в состав Уникальной научной установки ФГБНУ ВИЛАР «Биологическая коллекция специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС)».

Изучение влияния МОФФ ОШ на показатели сосудисто-тромбоцитарного (первичного) и коагуляционного (вторичного) гемостаза в условиях *in vivo* выполнено в ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России на 30 крысах-самцах Wistar массой тела 150–270 г. Исследования выполнены в соответствии с Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (г. Страсбург, 1986 г.) и согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Дизайн эксперимента одобрен биоэтической комиссией.

Животные были разделены на три группы по 10 особей в каждой и содержались в идентичных условиях. Животные опытной группы получали суспензию МОФФ ОШ в изотоническом растворе натрия хлорида в дозе 25 мг/кг на протяжении 14 дней, контрольной группы – эквивалентное количество изотонического раствора натрия хлорида, ин-

тактной группы – не подвергались каким-либо воздействиям. По окончании периода введения экспериментальных животных, которые были предварительно наркотизированы препаратом «Телазол», взвешивали и осуществляли забор крови.

Кровь для проведения диагностических исследований в объеме 5 мл забирали из печеночного синуса крыс в полистироловый градуированный шприц с широкой иглой, содержащий 0,11 М (3,8%) трехзамещенного 5,5-водного цитрата натрия (соотношение крови и цитрата – 9:1), согласно рекомендации NCCLS (Американский комитет стандартизации клинических лабораторий, стандарт H21-A5 2008). Цельную кровь, стабилизированную раствором цитрата натрия, использовали для исследования количества тромбоцитов при помощи гематологического анализатора «Drew3» (Drew Scientific, США), а также оценки состояния системы свертывания крови интегральным методом – тромбоэластографией, при добавлении к ней активатора процесса свертывания (0,2 моль/л хлорид кальция).

Запись тромбоэластограммы проводили на аппарате «RotemGamma» (Rotem, Германия) в режиме Natem в течение 40 мин с использованием активатора «Star-tem».

Оценивались следующие параметры тромбоэластограммы [9]: *время коагуляции в секундах* – время от момента внесения реагента до достижения тромбоэластограммой амплитуды в 2 мм, отражает фазу инициации свертывания крови; *время формирования сгустка в секундах* – время изменения амплитуды тромбоэластограммы с 2 мм до 20 мм, характеризует фазу усиления процесса тромбообразования; *угол «альфа» в градусах* – угол между продольной осью тромбоэластограммы и прямой, проведенной по касательной к тромбоэластограмме из точки, соответствующей амплитуде сгустка 2 мм, отражает кинетику образования сгустка и характеризует фазу распространения процесса свертывания крови; *максимальная твердость сгустка в миллиметрах* – показатель, соответствующий максимальной амплитуде сгустка и отражающий функции тромбоцитов и фибриногена; *максимальный лизис в процентах* – характеризует уровень максимального фибринолиза, зарегистрированного в течение анализа, определяется как нахождение самой низкой амплитуды после достижения максимальной твердости сгустка; *A₁₀ в миллиметрах* – описывает плотность сгустка (или амплитуду), полученную через 10 мин, и дает прогноз по ожидаемой плотности максимальной твер-

дости сгустка на более ранней стадии.

Для оценки значимости различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли параметрический *t*-критерий Стьюдента, для ненормального распределения – *U*-критерий Манна–Уитни. Вычисляли среднее значение (*M*) и стандартную ошибку среднего (*m*). Различия между сравниваемыми значениями считали достоверными при уровне вероятности 95% и более ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении биологической активности объектов исследования предварительно определяли форму зависимости скорости реакции от концентрации вещества в пробе. Установлено, что зависимость скорости ферментативных реакций *in vitro* от концентрации изучаемых образцов описывается кривой с максимумом, который соответствует оптимальной концентрации образца в пробе. Поэтому для оценки непосредственного действия образцов на протекание ферментативных реакций использовали скорости реакций, полученные при оптимальной концентрации изучаемых веществ (3,3 мкг/мл). Контрольная проба не содержала объекты исследования. Полученные результаты по влиянию объектов на скорость глутатионредуктазной (ГР) и каталазной (КАТ) реакций *in vitro* представлены в табл. 1.

В присутствии образца № 1 (МОФФ ОШ) скорость ГР-реакции увеличивалась на 44% от контроля, а КАТ-реакции – на 6% (табл. 1), что свидетельствует о наличии у данного объекта исследования антиоксидантных свойств [10]. Как видно из приведенных данных, препарат сравнения Detralex® также оказывал активирующее влияние на ГР (увеличение скорости на 59%) и на КАТ (на 15%), что также свидетельствует о его антиоксидантном действии.

В табл. 2 представлены результаты влияния объектов исследования на скорость iNOS-реакции.

Из результатов, представленных в табл. 2, следует, что в экспериментах *in vitro* внесение МОФФ ОШ (образец № 1) и препарата сравнения Detralex® (образец № 2) в пробу приводит к снижению скорости iNOS-реакции по сравнению с контролем в 2,8 и 1,4 раза соответственно, что подтверждает противовоспалительную активность исследуемых образцов [2].

Состояние системы гемостаза подопытных животных *in vivo* изучали интегральным методом – тромбоэластографией (табл. 3).

Таблица 1. Результаты измерения скорости GP- и KAT-реакций

Вариант опыта	Скорость реакции, $M \pm m$			
	Глутатионредуктазная		Каталазная	
	мкмоль/(мин на мг белка)	%	мкмоль/(мин на мг белка)	%
Контроль	3,02±0,14	100	1,75±0,08	100
Образец № 1	4,35±0,21*	144	1,85±0,09*	106
Образец № 2	4,80±0,22*	159	2,01±0,09*	115

Примечание: * – достоверность отличий от контроля при $p < 0,05$.

Таблица 2. Результаты измерения скорости iNOS-реакции

Вариант опыта	Скорость ферментативной реакции, катализируемая iNOS <i>in vitro</i>	
	мкмоль НАДФН/мг белка в мин ($M \pm m$)	Опыт/контроль, %
Контроль	7,76±0,11	100
Образец № 1	2,74±0,13*	35
Образец № 2	5,48±0,19	75

Примечание: * – достоверность отличий от контроля при $p < 0,05$.

Таблица 3. Показатели гемостаза экспериментальных групп животных, установленные методом тромбозаграфии

Показатель	Интактная группа ($n=10$)	Контрольная группа ($n=10$)	Опытная группа ($n=10$)
Время коагуляции (СТ), с	242,0 [206,3–281,0]	231,0 [125,0–247,0] $p_{и-к}=0,06$	201,0 [186,3–206,3] $p_{и-о}=0,005$ $p_{к-о}=0,7$
Время формирования сгустка (CFT), с	105,0 [96,0–113,0]	128,0 [78,0–145,0] $p_{и-к}=0,9$	104,0 [82,3–133,0] $p_{и-о}=0,5$ $p_{к-о}=0,6$
Угол «альфа» (α), °	69,0 [67,0–71,0]	65,0 [63,0–77,0] $p_{и-к}=0,8$	69,0 [64,3–73,5] $p_{и-о}=0,6$ $p_{к-о}=0,8$
Максимальная твердость сгустка (MCF), мм	57,0 [55,0–63,0]	56,0 [54,0–63,0] $p_{и-к}=0,7$	57,0 [55,0–63,3] $p_{и-о}=0,5$ $p_{к-о}=0,8$
Максимальный лизис (ML), %	1,0 [0,0–3,0]*	0,0 [0,0–0,0]* $p_{и-к}=0,9$	2,5 [0,0–21,8] $p_{и-о}=0,1$ $p_{к-о}=0,1$
Плотность сгустка (A_{10}), мм	54,0 [46,0–55,0]	47,0 [43,0–54,0] $p_{и-к}=0,7$	51,5 [46,0–55,8] $p_{и-о}=0,6$ $p_{к-о}=0,4$

Примечание: данные представлены как медиана в выборочной совокупности, 25-й и 75-й перцентили [25–75%]; n – число наблюдений; p – уровень значимости различий, определяемый непараметрическим методом U -критерий Манна–Уитни (и – интактная, к – контрольная, о – опытная группы); * – ненормальное распределение признаков.

В эксперименте на тромбозаграмме животных опытной группы было зафиксировано укорочение времени коагуляции (СТ) на 16,9% ($p=0,005$) в сравнении с интактными животными и на 12,9% ($p=0,7$) – по отношению к показателю, измеренному у контрольной группы, что свидетельствует о гиперкоагуляционных сдвигах. Однако остальные показатели у животных опытной группы достоверно не отличались от показателей интактных крыс и крыс контрольной группы.

Время формирования сгустка у опытной группы (CFT = 104,0 с) короче, чем у интактной (CFT = 105,0 с) и контрольной (CFT = 128,0 с) групп на 0,95% ($p=0,5$) и 18,75% ($p=0,6$) соответственно.

Показатели угол «альфа» и максимальная твердость сгустка у опытной группы не отличались от интактной группы животных (ALP = 69,0°, MCF = 57,0 мм), но отличались от аналогичных показателей контрольной группы (ALP = 65,0°, MCF = 56,0 мм) на 6,15% ($p=0,8$) и 1,78% ($p=0,8$) соответственно.

Показатель максимального лизиса у животных опытной группы составил 2,5%, у животных интактной группы – 1,0%, что свидетельствует о частичном лизисе сгустка.

Исходя из приведенных данных, можно предположить, что МОФФ ОШ курсового приема в дозировке 25 мг/кг в сутки в течение 14 дней вызывает частичную активацию системы гемостаза у крыс, ускоряя наступление фазы инициации свертывания крови.

ВЫВОДЫ

Таким образом, исследования, проведенные *in vitro* с применением специфических ферментных биотест-систем, показали, что опытный образец МОФФ ОШ обладает антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, сопоставимыми с таковыми у препарата сравнения.

В эксперименте *in vivo* достоверно установлено, что МОФФ ОШ после предварительного курсового введения в дозе 25 мг/кг вызывает частичную активацию системы гемостаза у крыс-самцов Wistar, ускоряя наступление фазы инициации свертывания крови. Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что дальнейшие исследования необходимо проводить в рамках подбора оптимальной дозировки (не более 25 мг/кг) исследуемого препарата и более подробного изучения влияния комплекса флавонои-

дов облепихового шрота на систему гемостаза и стенки кровеносных сосудов.

Последующие исследования флавоноидной фракции облепихового шрота имеет важное практическое значение, так как в перспективе возможно создание нового лекарственного средства флебопротекторного действия, снижающего риск тромбозов при ряде заболеваний сердечно-сосудистой системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аверьянова Е.В., Школьникова М.Н., Рожнов Е.Д. и др. Исследование биологической активности флавоноидов облепихового шрота с применением специфических биотест-систем. Химия растительного сырья. 2020; 4: 235–241. DOI 10.14258/jcprm.2020048859.
2. Теплова В.В., Исакова Е.П., Кляйн О.И. и др. Природные полифенолы: биологическая активность, фармакологический потенциал, пути метаболической инженерии. Прикладная биохимия и микробиология. 2018; 54(3): 215–235.
3. Slobodnikova L., Fialova S., Rendekova K. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. Molecules. 2016; 12: 753–766.
4. Степанова Э.Ф., Ремезова И.П., Шевченко А.М. и др. Флебопротекторы на базе флавоноидов: лекарственные формы, биофармацевтическая характеристика, технологические особенности. Фармация и фармакология. 2020; 8(6): 405–415. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-6-405-415.
5. Дунаевская С.С. Хроническая венозная недостаточность – взгляд на проблему. РМЖ. Медицинское обозрение. 2018; 2(II): 60–63.
6. Богачев В.Ю., Болдин Б.В., Туркин П.Ю. Детралекс – флебосклерозирующее лечение. Результаты национальной многоцентровой наблюдательной программы. Ангиология и сосудистая хирургия. 2018; 24 (1): 102–106.
7. Воронков А.В., Гамзельва О.Ю. Обзор современных флеботропных препаратов на основе флавоноидов как перспективных эндотелиопротекторов при лечении хронических заболеваний вен. Амбулаторная хирургия. 2019; 1–2: 27–33. DOI: <https://doi.org/10.21518/1995-1477-2019-1-2-27-33>.
8. Патент РФ 2711728 С1. Способ получения комплекса биофлавоноидов из обезжиренного облепихового шрота. Е.В. Аверьянова, М.Н. Школьникова, А.В. Малахова, Е.Д. Рожнов. 2020.
9. Лычева Н.А., Шахматов И.И., Киселев В.И., Вдовин В.М. Изучение отставленного влияния гипотермии на параметры системы гемостаза у крыс. Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2014; 34: 25–29.
10. Патент № 2181892 Российская Федерация. Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, *in vitro*. В.А. Быков, В.А. Дубинская, М.Ф. Минеева, Л.Б. Ребров, В.К. Колхир, опубл. 27.04.2002. 7 с.
11. Стрелкова Л.Б., Кондакова Н.В., Дубинская В.А. и др. Индуцибельная NO-синтаза как ферментная биотест-система для выявления веществ с противовоспалительными свойствами *in vitro*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2013. №11. С. 75–80.

Поступила 18 июня 2022 г.