

На правах рукописи

ЛУПАНОВА Ирина Александровна

**МЕТОДОЛОГИЯ ФОРМИРОВАНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ
СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ
ДЛЯ ОЦЕНКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР)

Научный консультант:

Мизина Прасковья Георгиевна – доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

Официальные оппоненты:

Мирошников Анатолий Иванович – доктор химических наук, академик РАН, научный руководитель направления «Биотехнология», заведующий отделом биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН)

Береговых Валерий Васильевич – доктор технических наук, академик РАН, профессор кафедры Промышленной фармации Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), начальник отдела медицинских наук РАН – Заместитель академика-секретаря по научно организационной работе, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российская академия наук»

Шимановский Николай Львович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий НИЛ молекулярной фармакологии НИИ трансляционной медицины, заведующий кафедрой молекулярной фармакологии и радиобиологии имени академика П.В. Сергеева ИБ (МБФ), Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы"

Защита состоится «24» июня 2025 года в 11.00 часов на заседании диссертационного совета 99.0.027.03 федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» (125047, г. Москва, Миусская пл., 9), в конференц-зале (ауд.443).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» и на сайте <http://diss.muctr.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2025 года

Ученый секретарь диссертационного совета
99.0.027.03, кандидат технических наук



И.В. Шакир

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования обусловлена бурным развитием в области рационального использования ресурсов лекарственных растений и получения высококачественных средств на их основе.

Особенную роль в реализации исследований отводится биотест-системам различных уровней (Таблица 1).

Таблица 1 – Уровень организации биологических тест-систем

№ п/п	Уровень биотест-систем	Примеры
1.	Организменный	Животные, в том числе лабораторные
2.	Тканевый	Изолированные органы или ткани растений, животных и человека
3.	Клеточный	Культуры клеток растений, животных и человека
4.	Микроорганизменный	Различные виды микроорганизмов: бактерии, вирусы, грибы и др.
5.	Молекулярный	ДНК, белки, ферменты , рецепторы и др.

Согласно OECD Guide 1:1998 OECD Principles of good laboratory practice (Принципы надлежащей лабораторной практики) они имеют разный уровень организации: физические, химические и биологические, последние представляют собой организмы (животные, растения), изолированные органы и ткани, клеточные и молекулярные структуры. При этом корректный выбор тест-систем, а также их соответствие целям и задачам исследования обеспечивают его высокий уровень (Зайцева М. А. и др., 2020).

Как правило, при проведении биологических исследований для определения таких качественных показателей, как эффективность и безопасность лекарственных средств, принято использовать лабораторных животных (организменный уровень). Однако биоэтическая концепция «трёх R» (Replacement, Reduction, Refinement), ставшая международным стандартом их использования, определяет необходимость совершенствования методологических подходов к проведению исследований (Каркищенко Н. Н.,

2010; Коробейникова Е. П. и др., 2016), одним из которых является сокращение количества лабораторных животных (Yang W. et al., 2021). При этом индустриальные масштабы испытаний и их промышленная организация требуют увеличения на порядки производительности системы и обеспечения возможности работы с малым количеством испытуемого соединения.

Одним из вариантов решения проблемы расширения возможностей в области оценки биологически активных соединений (БАС) может быть использование тест-объектов молекулярного уровня, так как получение данных о прямом связывании БАС с мишенями, в качестве которых могут выступать ключевые ферменты гомеостаза, позволит более детально описывать схему их взаимодействия, обосновывать их применение и производить их скрининг. Это свидетельствует о необходимости перехода от тест-объектов организменного уровня к молекулярным тест-системам. Однако они не являются универсальными и не позволяют многопланово охарактеризовать биологическую активность соединений (Prashanth J. R. et al., 2017; Jarocha K. et al., 2018; Mittal R. et al., 2019).

Проведение подобных исследований требует адекватных инструментов и подходов к разработке тест-систем молекулярного уровня, позволяющих оценивать БАС различного происхождения и агрегатного состояния, что и определило цели и задачи данного диссертационного исследования.

Степень разработанности темы

Известны работы отечественных и зарубежных ученых, посвященных оптимизации исследований различных БАС.

В работах Gavernet L. (2008), Rollinger J. M. (2009); Hein M. (2010), Shuster D. (2010), Wolber G. (2013), Zheng F. (2014); Hoffman T. (2019) рассматриваются виртуальные методы *in silico* для изучения БАС. Однако полученные результаты носят прогнозируемый характер и требуют обязательного подтверждения в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Для исследования растительных БАС Колхир В. К. (2002), Бродова М. С. (2003), Быков В. А. и соавт. (2008), Стрелкова Л. Б. и соавт. (2013), Дубинская

В. А. и соавт. (2014) использовали ограниченное количество единичных специфических ферментных биотест-систем (СФБТС), что послужило началом для разработки методологии формирования и применения СФБТС для оценки БАС различного происхождения и агрегатного состояния.

Для оптимального исследования биологической активности различных соединений необходимо поэтапное использование различных методов: *in silico* (виртуальное прогнозирование для выбора молекулярных мишеней), *in vitro* (выявление биологической активности с использованием ферментов в качестве тест-объектов) и проведение сравнительного изучения БАС на биологических моделях с использованием лабораторных животных (организменный уровень биотест-систем).

Цель – теоретически обосновать, разработать методологию формирования и применения специфических ферментных биотест-систем *in vitro* для оценки биологически активных соединений и экспериментально подтвердить ее работоспособность.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие основные **задачи**:

1. Теоретически обосновать молекулярный уровень биотест-систем и выбрать с использованием методов *in silico* ферменты в качестве тест-объектов в специфических ферментных биотест-системах (СФБТС) для оценки различных БАС.

2. Разработать СФБТС на основе отобранных и выделенных ферментов, сформировать и утвердить Биологическую коллекцию специфических ферментных биотест-систем (Реестр и Положение) и нормативную документацию к ней (методы ее поддержания).

3. Апробировать первичные и вторичные ферментные биотест-системы на простых и сложных БАС различного происхождения и агрегатного состояния.

4. Провести сравнительные исследования результативности молекулярных биотест-систем (СФБТС) и биотест-систем организменного уровня (экспериментальные модели на лабораторных животных).

5. Рассчитать затраты при использовании молекулярных и организменных биотест-систем при оценке БАС.

6. Разработать методику и стандартные операционные процедуры (СОП) применения СФБТС для оценки БАС.

Научная новизна

Впервые предложена и разработана методология формирования и применения специфических ферментных биотест-систем для оценки биологически активных соединений растительного происхождения разного агрегатного состояния и показана возможность их использования для оценки других объектов с аналогичной биологической активностью.

Впервые разработана и утверждена Биологическая коллекция специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (Положение о Биологической коллекции СФБТС *in vitro*), задачами которой является: хранение и отбор биотест-систем *in vitro*, участвующих при проведении испытаний БАС; сохранение СФБТС, имеющих утвержденный и зарегистрированный в ФГБНУ ВИЛАР СОП и входящие в Реестр СФБТС. Также впервые разработан и утвержден порядок работы с их использованием, отраженный в разработанных автором нормативных документах.

Научная новизна исследования подтверждена патентами РФ на изобретение №№ 2676085, 2771028 и 2802434.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость заключается в разработке научных основ оценки *in vitro* БАС различного происхождения и агрегатного состояния за счет использования СФБТС, соответствующих основным молекулярным мишеням в организме человека. На основании проведенных исследований сформирована Биологическая коллекция СФБТС. Предлагаемая методология позволяет оптимизировать оценку БАС в процессе их получения (включая выделение, фракционирование и очистку) и определить их перспективность для создания готовых лекарственных средств на их основе.

Практическая значимость заключается в использовании Биологической коллекции первичных и вторичных СФБТС, Методических рекомендаций и СОП на использование СФБТС *in vitro* для оценки биологической активности различных пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмерно-косметических средств для расширения информативности, снижения временных, финансовых и трудовых затрат, уменьшения количества лабораторных животных в эксперименте в соответствии с концепцией «трех R».

По результатам исследования Министерство здравоохранения Российской Федерации (Департамент науки и инновационного развития здравоохранения письмо от 13.02.2023 № 27-3/193) подтвердило право разработчиков тех или иных лекарственных средств использовать СФБТС в доклинических исследованиях, а также «проинформировало подведомственные Минздраву России научные организации и образовательные организации высшего образования о наличии указанных исследовательских опций».

Методология и методы исследования.

При формировании биологической коллекции СФБТС с использованием ферментов в качестве тест-объектов и создании методологии оценки биологически активных соединений учитывали результаты ранее проведенных исследований отечественных учёных: М. Ф. Минеевой, В. К. Колхира, А. И. Арчакова, Н. Н. Каркищенко и др.

При выполнении диссертационной работы использованы биологические (в том числе микробиологические), физико-химические, математические методы анализа и обработки результатов, отвечающие поставленным задачам.

Основные положения, выносимые на защиту:

- формирование Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем (Реестра и Положения) и перспективы использования первичных и вторичных СФБТС этой коллекции;
- разработанные Методические рекомендации и Стандартные операционные процедуры (СОП) по использованию СФБТС из утвержденной Биологической коллекции;

- целесообразность использования СФБТС при оценке субстанций и готовых лекарственных форм;
- приемлемость методологии использования СФБТС для оценки биологически активных соединений различного происхождения и агрегатного состояния для использования их в качестве ингредиентов для создания пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмерно-косметических продуктов на их основе.

Достоверность научных положений и выводов подтверждена соответствующим объемом экспериментальных данных, использованием современных методов исследования с применением сертифицированного оборудования на поверенных приборах, биотест-систем коллекции ФГБНУ ВИЛАР, лабораторных животных, полученных из сертифицированных питомников, статистической обработкой полученных данных и их сопоставлением с данными научной литературы.

Апробация результатов исследования. Ключевые разделы исследований были представлены на XX, XXVII Росс. Нац. Конгр. «Человек и лекарство» (Москва, 2013, 2020); на Всероссийской конференции с международным участием посвященной 95-летию со дня рождения профессора Алексея Ивановича Шретера (Москва, 2014); на третьей, пятой, седьмой, восьмой, девятой международных научно-практических конференциях «Молодые ученые и фармация XXI века» (Москва, 2015, 2017, 2019, 2020, 2021); на Международном научном симпозиуме Витактива-Фито (Москва, 2017); на Международной научно-практической конференции «Биологические особенности лекарственных и ароматических растений и их роль в медицине» (Москва, 2016); на 23-й и 28-й объединённых Российских Гастроэнтерологических неделях (Москва, 2017, 2023); на пятой Междисциплинарной конференции «МОБИ-Фарма» (Судак, 2019; Санкт-Петербург, 2023; Сыктывкар, 2024); на Международной научной конференции «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Москва, 2020); на международных научных конференциях «От растения до

лекарственного препарата» (Москва, 2020, 2021); на II, III, IV Международных симпозиумах «Innovations in Life Sciences» (Белгород, 2020, 2021, 2022, 2024); на конференции «Растительные адаптогены в восстановительной медицине» (Улан-Удэ, 2021); на VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (Орехово-Зуево, 2021, 2022, 2024); на международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2021); на международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека» (Москва, 2022); на IX Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2023); на II Всероссийском научном семинаре «Высоко- и супрамолекулярные соединения: исследования, контроль, мониторинг» (Пермь, 2023).

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, постановке цели и задач, организации и участии в проведении экспериментов, анализе, обобщении полученных данных и их статистической обработке. Вклад автора является определяющим на всех этапах исследования. Диссертация, автореферат и нормативная документация написаны лично автором.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования нашли свое отражение в сформированной и утвержденной в ФГБНУ ВИЛАР Биологической коллекции СФБТС и нормативной документации для ее поддержания, а также внедрены в работу ЗАО НАУЧНЫЙ ЦЕНТР «ФАРМВИЛАР» от 13.02.2024, ЗАО «ВИФИТЕХ» от 17.02.2024, АО «Фармцентр ВИЛАР» от 22.01.2024, АО «ЭКОлаб» от 12.02.2024, АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» от 14.02.2022, НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга (г. Томск) от 24.02.2022; в учебный процесс Института наук о жизни и биомедицине (Школе) ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный

университет» от 15.03.2022; кафедр общей и клинической фармакологии с курсом микробиологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет» Минобрнауки РФ от 11.04.2022; фармакологии им. ЗДН РФ профессора А.А. Лебедева ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ от 16.03.2022; фармакологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» МЗ РФ от 16.05.2022, а также используются в тематике научно-исследовательских работ ФГБНУ ВИЛАР (<https://vilarnii.ru/biokollektsii/>).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научное положение диссертационной работы соответствует паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология (биологические науки), пунктам: 1 – Молекулярная биотехнология, генетическая и метаболическая инженерия, 7 – Прикладная энзимология, включая ферментные системы, технологии очистки белков, прикладные аспекты белковой инженерии, 12 – Биотехнология растительных и животных клеток. Контроль качества и оценка безопасности пищевых, медицинских, ветеринарных и парфюмерно-косметических биопрепаратов.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки. Настоящая работа является частью комплексных научных исследований в соответствии с планом научно-исследовательских работ Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР) по темам: № 0576-2014-0009 «Поисковые исследования экстрактов, фракций, индивидуальных соединений, очистке БАС, предшественников из лекарственного растительного сырья, модификаций БАС и их идентификации» и № 0576-2014-0014 «Изучение биологической активности экстрактов, фракций, индивидуальных веществ, в том числе полученных методом модификации природных соединений, субстанций из нативного и биотехнологического сырья с применением биотест-систем, микробиологических методов и иных биомоделей».

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 266 страницах, состоит из введения, обзора литературы (I глава), материалов и методов исследований (II глава), 6 глав экспериментальных исследований, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 343 источников, в том числе 242 – на иностранных языках. Работа иллюстрирована 54 рисунками и 51 таблицей.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликованы 48 научных работ, в том числе 19 статей – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, из них в базах данных Scopus и Web of science – 6 (Q1-1 статья), 2 монографии, получены 3 патента РФ на изобретение.

Этапы диссертационного исследования. Этапы формирования методологии создания СФБТС и их применения представлены на Рисунке 1.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объекты исследования – растительные:

1) *экстракты сухие*, разработанные в ВИЛАР:

- винограда культурного (*Vitis vinifera* L.) различных сортов, красные листья (Патент № 2568908 C1, 2015);
- цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) с содержанием фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту в траве (дикорастущее сырьё) – $8,1 \pm 0,37\%$, в листьях (культивируемое сырьё) – $10,2 \pm 0,49\%$ (Патенты №№ 2710270, 2019; 2771028, 2022);
- володушки золотистой (*Bupleurum aureum* L.), трава с содержанием фенольных соединений в пересчете на рутин $8,0 \pm 0,5\%$ (Патент № 2568586C1, 2015);
- серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.), трава с различным содержанием 20-гидроксиэкдизона: 4, 7 и 24%;
- витекса священного (*Vitex agnus-castus* L.) и витекса китайского (*Vitex negundo* L.) плоды;

- женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* C.A. Mey) корни и суспензионная культура (линия Pa.g(S)14ВИЛАР);
- родиолы розовой (*Sedum roseum* (L.) Scop.) корни и корневища и суспензионная культура (штамм Rr(S)2013ВИЛАР);

2) экспериментальные лекарственные формы, разработанные в ВИЛАР:

- валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis* L. s. l.) и пустырника сердечного (*Leonurus cardiaca* L.) настойки, полученные на спирте этиловом разной концентрации из лекарственного растительного сырья в соотношении 1:5 (пустырника трава и валерианы лекарственной корневища с корнями, концентрация спирта этилового – 36%);
- таблетки для рассасывания с жидким растительным экстрактом из цветков ромашки, цветков календулы, травы тысячелистника;
- таблетки (Патент № 2608126, 2017) с экстрактами листьев эвкалипта прутовидного (Эвкалимин) и травы эхинацеи пурпурной (Эстифан);
- растворы (спрей) (Патент № 2604133, 2016; Патент № 2600795, 2016) и таблетки (Патент № 2608126, 2017) с экстрактами Эвкалимина и Эстифана;

3) препараты сравнения:

- Антистакс® (капсулы, серия 097432001, годен до 12.2012 (эксперимент 2011 г.) Фарматон СА, Швейцария);
- Экдистен® (таблетки, серия 010116, годен до 02.18 (эксперимент 2016 г.), ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия);
- Силимар® (таблетки, серия 010220, годен до 03.25 (эксперимент 2021 г.), «Фармцентр ВИЛАР», Россия);
- Пустырника настойка (серия 010820, годен до 09.23 (эксперимент 2020 г.), ЗАО «ЭКОлаб», Россия);
- Валерианы настойка (серия 050920, годен до 10.23 (эксперимент 2020 г.), ЗАО «ЭКОлаб», Россия);
- Ротокан экстракт жидкий (серия 071217, годен до 01.2022 (эксперимент 2016 г.), ООО НПО «ФармВИЛАР», Россия);

4) *стандартные образцы*, представленные Центром химии и фармацевтической технологии ВИЛАР:

- цикориевая кислота (CAS 6537-80-0, C7243 Merck Life Science LLC, содержание основного вещества $\geq 95\%$);
- хлорогеновая кислота (CAS 327-97-9, C3878 Merck Life Science LLC, содержание основного вещества $\geq 95\%$);
- ресвератрол (CAS 501-36-0, R5010 Sigma-Aldrich, содержание основного вещества $\geq 99\%$);
- агнузид (CAS 11027-63-7, SMB00189 Sigma-Aldrich, содержание основного вещества $\geq 99\%$).

СФБТС на основе выделенных ферментов:

- из микросом печени крыс *цитохрома P450* (цит P450) и *глутатионтрансферазы* (ГТФ) для оценки *антитоксической активности* БАС.

Состав цитP450 СФБТС: 0,1 М К-фосфатный буфер (pH 7,4), 3 мМ диметиланилина или 3 мМ анилина, концентрация микросомального белка в пробе составляла 1 мг/мл, 3мМ НАДФН. Состав глутатионтрансферазной СФБТС: 0,1 М К-фосфатный буфер (pH 7,4), 0,7 мМ 2,4-динитрохлорбензол, 1 мМ глутатион восстановленный, концентрация микросомального белка в пробе составляла 0,15 мг/мл;

- из гомогената лейкоцитов *тирозингидроксилазы* (ТГ) для оценки *дофаминергической активности*. Состав: трис-малеиновый буфер (pH 6,2), 0,5 мг/мл каталаза, 0,5 мг/мл 3-окси-6-метил-2-этил-пиридина гидрохлорид, 1 мг/мл L-тирозин, (в 0,005 Н HCl), 1,67 мг/мл ДМПН4 (в 0,005 Н HCl);

- из гомогената лейкоцитов *НАДФН-оксидазы* для оценки *иммуномодулирующей активности* БАС. Состав: 65 мМ К, Na-фосфатный буферный раствор (pH 5,5), 0,83 мМ НАДФН, гомогенат спокойных лейкоцитов крови из расчета 1 млн клеток в 1 мл.

- коммерческих препаратов: *каталазы (КАТ)* и *глутатионредуктазы (ГР)* для оценки *антиоксидантной/антимикробной/адаптогенной активности* БАС.

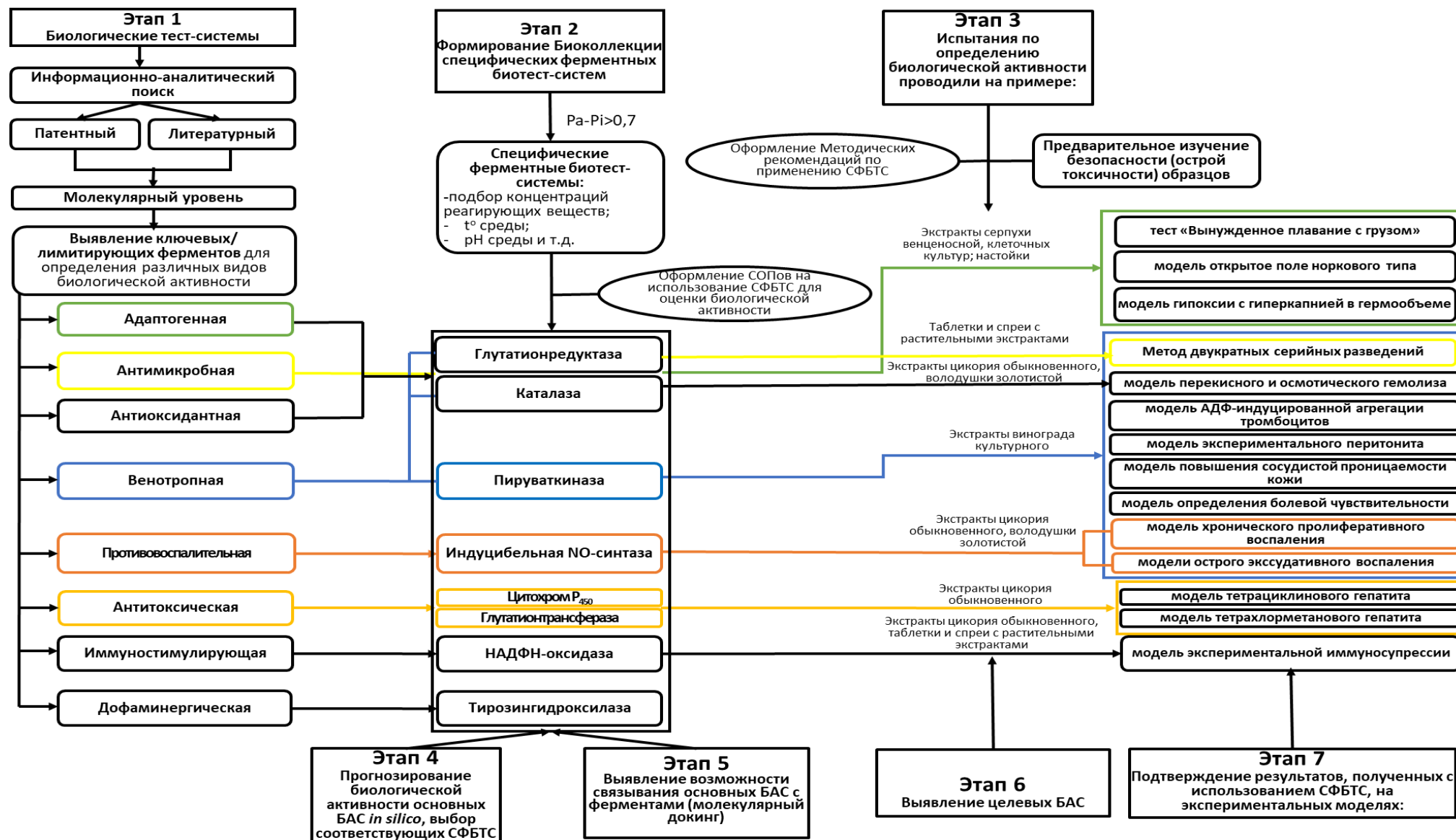


Рисунок 1 – Этапы исследования по созданию методологии формирования и применения СФБТС

Состав каталазной СФБТС: каталаза 0,04 мг, К-, Na-фосфатный буфер (рН 7,4), 4%-й раствор молибдата аммония, 0,03% перекиси водорода. Состав глутатионредуктазной СФБТС: 0,05 М трис-ЭДТА буферный раствор (рН 8,0), ГР в конечной концентрации 0,1 мкг/мл, 3,3 мМ глутатион окисленный, 0,1 мМ НАДФН;

– коммерческих препаратов: *пируваткиназы* (ПК) для оценки *энергизирующей активности* БАС. Состав: трис-ЭДТА буферный раствор (рН 7,5), 0,1 М хлорид магния.

Методы исследования:

- 1) ***in silico***: PASS (Свидетельство Роспатента № 2006613275 от 15.09.06) и PharmaExpert (Свидетельство Роспатента № 2006613590 от 16.10.06) – работа выполнена совместно с ФГБНУ ИБМХ (д-р биол. наук, профессор Поройков В. В., н. с. Ионов Н. С.); Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD) – работа выполнена совместно с ФГАОУ ВО НИ ТПУ (д-р. хим. наук, профессор Хлебников А. И.);
- 2) ***in vitro***: спектрофотометрия (измерение скорости ферментативных реакций, определение содержания белка в суспензии микросом (метод Lowry О.Н.), в том числе цитохрома Р450 (метод Omura Т., Sato R.), подтверждение антиоксидантной активности БАС (Миронов А. Н., Руководство..., 2012) (анализатор Clima MC-15 (Испания), Shimadzu MPS-2000 (Япония));
- 3) ***ex/in vivo***: *биологические*: экспериментальные модели острого экссудативного воспаления у мышей и крыс, вызываемого введением под апоневроз задних лап флогенных агентов, формалина и каррагенина (по Тринус Ф. Н.); осмотического гемолиза (совместно с Институтом общей и экспериментальной биологии СО РАН); оценки влияния на выживаемость мышей в стандартном тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией (Миронов А. Н., 2012); оценки влияния на сон у мышей по стандартной методике с использованием хлоралгидрата (300 мг/кг, п/к) (Миронов А. Н., 2012); открытое поле норкового типа на крысах (Миронов А. Н., 2012); гепатита, вызываемого 4-дневным внутрижелудочным введением тетрациклина (по Скаун Н. П., Высоцкому И. В.); масляного раствора четыреххлористого углерода (CCl₄) (по Левшину В. И.).

В экспериментах использованы 752 белые беспородные мыши-самцы с исходной массой тела 18,0–22,0 г, 412 нелинейных белых крыс-самцов с массой тела 180,0–200,0 г. Животных получали из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России и содержали в условиях сертифицированного вивария ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе со свободным доступом к корму (полноценный комбикорм ПК-120 для содержания лабораторных животных, ГОСТ Р 50258-92, ООО «Лабораторкорм») и воде. Фармакологические исследования проводили согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 1986) и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010. по охране животных, используемых в научных целях. Дизайн исследований одобрен биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР.

Острую токсичность объектов исследования определяли по методу Кербера (Миронов А. Н., Руководство..., 2012) на белых беспородных мышак-самцах с исходной массой тела 20,0–22,0 г при введении *per os* с помощью внутрижелудочного зонда. Функциональное состояние печени крыс оценивали по показателям активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), по содержанию общего билирубина, глюкозы и холестерина в сыворотке крови (биохимический анализатор CS-T240 Dirui, Китай). Патоморфологические исследования печени крыс проводили по гистологическим методикам (Миронов А. Н., 2012). Гистологическое строение печени оценивали при окраске срезов гематоксилином и эозином. Морфологические исследования проводили с помощью микроскопа «Axio LAB.A1» с цифровой камерой «AxioCam ERc5s» с программным обеспечением для анализа изображений Axio Vision SE64 Rel.4.8.3 и ZEN 2012.

Антимикробную активность объектов исследования определяли методом двукратных серийных разведений (Миронов А. Н., 2012) в отношении аэробных

бактерий и грибов: *Staphylococcus aureus* 209-P, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 6896), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) (ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича»), *Candida albicans* (ATCC 10231) (ГосНИИГенетика); *Microsporum canis* (352) (ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии»).

Математические методы: для статистической обработки полученных цифровых данных использовали пакет прикладных программ Statistica version 13 (TIBCO Software Inc, США). Проверку вариационных рядов на нормальность распределения проводили с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. Для оценки значимости различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли параметрический *t* критерий Стьюдента. Вычисляли среднее значение (*M*) и стандартную ошибку среднего (*m*). Для оценки значимости различий выборок, имеющих ненормальное распределение, применяли непараметрический *U*-критерий Манна – Уитни. Результаты представлены в виде медианы (*Me*), нижнего (*L* 25%) и верхнего квартилей (*U* 75%); различия между сравниваемыми значениями считали достоверными при уровне вероятности 95% и более ($p < 0,05$) (Ланг Т. А. и др., 2011; Боровиков В. П., 2014).

Экономические расчеты использованы для подтверждения целесообразности применения СФБТС в сравнении с биотест-системами организменного уровня (лабораторные животные).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Обоснование выбора ферментов в качестве тест-объектов молекулярного уровня для создания на их основе специфических ферментных биотест-систем

Проведенный информационно-аналитический поиск по существующим биологическим тест-системам для оценки БАС (патентный и литературный) показал необходимость формирования коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (как первичных, так и вторичных), позволяющих на молекулярном уровне выявлять биологическую активность различных соединений. Проведение подобных исследований требует адекватных

инструментов, к которым можно отнести разработанные в ФГБНУ ВИЛАР специфические ферментные биотест-системы (СФБТС).

Они позволяют на молекулярном уровне избирательно выявлять целевую биологическую активность, играющую главенствующую роль в искомой (целевой) фармакологической активности, проявляющейся на уровне физиологических процессов в организме. В опытах *in vitro*, то есть при добавлении изучаемого соединения непосредственно к ферменту, выбранному в качестве тест-объекта, и последующем измерении скорости ферментативной реакции в присутствии БАС, измеряется его прямое, непосредственное действие на фермент, которое зависит от способности соединений взаимодействовать с данным ферментом, то есть наличием или отсутствием его сродства к ферменту. Кроме того, изучение непосредственного (прямого) действия БАС на конкретные (целевые) биохимические мишени позволяет выявить молекулярную основу его фармакологического эффекта, которая играет ведущую роль в молекулярном механизме действия. СФБТС обладают высокой специфичностью и чувствительностью, хорошей воспроизводимостью и высокой экономичностью, эффективны при выборе оптимального технологического процесса выделения БАС, при их скрининге, при оценке качества различного сырья, в том числе полученного из культуры клеток растений и др. (Дубинская В. А. и др., 2016).

При создании СФБТС в качестве тест-объектов методом *in silico* выбирали ключевые и/или лимитирующие ферменты гомеостаза и учитывали возможность получения легко фиксируемого сигнала.

При создании СФБТС изучали влияние следующих факторов на скорость ферментативных реакций: температура, pH среды, концентрация фермента и субстрата и использовали те значения, при которых скорость реакций была максимальной.

Необходимые условия хранения ферментов и других компонентов, необходимых для функционирования соответствующих СФБТС, отработывали

при их тарировке и указывали в соответствующей нормативной документации (СОП, Методы).

Каждая СФБТС позволяет оценить соединения по одному биологическому параметру, поэтому для выявления активности в отношении патологий с многофакторным механизмом действия сочетали соответствующие первичные биотест-системы и формировали на их основе вторичные СФБТС.

По результатам исследований сформирован Реестр СФБТС (от 25.01.2017, с изменениями от 15.04.2024) и утверждена Биологическая коллекция первичных и вторичных специфических ферментных биотест-систем (БК-СФБТС) – Положение о БК-СФБТС от 27.01.2017 г. с изменениями от 15.04.2024 г.). Порядок работы с их использованием отражен в документах:

- 1) «Метод характеристики единиц хранения БК-СФБТС»,
- 2) «Метод расширения БК-СФБТС»,
- 3) СОП «Контроль качества единиц хранения БК-СФБТС»,
- 4) СОП «Коррекция нарушений качества единиц хранения БК-СФБТС»,
- 5) СОП «Поддержание единиц хранения БК-СФБТС».

1. Изучение безопасности биологически активных соединений

При оценке БАС обязательным является изучение их эффективности и безопасности, поэтому изучали параметры острой токсичности образцов, на примере которых проводили испытания по оценке их биологической активности с помощью СФБТС, и выявили, что у мышей всех групп в течение срока наблюдения (14 дней) не было клинических признаков интоксикации; образцы относятся к малотоксичным веществам, в соответствии с классификацией токсичности химических веществ по ГОСТу 32644-2014.

2. Испытание вторичной СФБТС для оценки венотропных свойств биологически активных соединений

Исследования проводили на примере сухих экстрактов листьев красных винограда культурного (*Vitis vinifera* L.). Специфичность и достоверность полученных результатов оценивали в сравнении с референтным препаратом Антистакс® и стандартным образцом ресвератрола. Основными компонентами в

исследуемых экстрактах являются полифенольные соединения – ресвератрол, рутин, кверцетина глюкуронид и др.

Патология нарушения венозной системы представляет собой комплекс различных нарушений, в связи с чем для выявления венотропных свойств БАС, целесообразно применять несколько СФБТС, позволяющих на биохимическом уровне выявлять корреляты определенных (целевых) видов фармакологической активности.

Для выбора мишеней, в качестве которых выступали тест-ферменты, изучили возможные виды биологической активности основных БАС субстанций в Программе PASS. Вероятность (Pa) фибринолитической, противовоспалительной и антиоксидантной активности ресвератрола по результатам оценки биологической активности *in silico* с помощью Программы PASS составляет 0,763; 0,766 и 0,697, а для кверцетина глюкуронида: антиоксидантной, венотонизирующей и фибринолитической: 0,860; 0,813 и 0,754, соответственно.

В связи с полученными результатами использовали сочетание глутатионредуктазной (ГР), пируваткиназной (ПК), каталазной (КАТ) первичных специфических биотест-систем, позволяющих, в совокупности, выявить: положительное стабилизирующее влияние на активность тиоловых ферментов, участвующих непосредственно в мышечном сокращении; энергизирующие свойства, позволяющие пополнять запасы АТФ за счет гликолитического фосфорилирования на уровне субстрата, обеспечивая энергией тоническое сокращение мышц без участия кислорода и антиоксидантные свойства путем непосредственного их влияния на активность данных ферментов, изменяя скорость ферментативных реакций (Рисунок 2).

Как показали результаты изучения влияния сухих экстрактов красных листьев винограда культурного в сравнении ресвератролом и Антистакс® на скорость глутатионредуктазной, каталазной и пируваткиназной реакций *in vitro*, наиболее выраженные антиоксидантные и энергизирующие свойства проявил экстракт из красных листьев винограда сорта Каберне Совиньон. Полученные

данные позволяют рекомендовать его как перспективный в качестве источника БАС с венотропной активностью. Результаты коррелируют с данными по спрогнозированной биологической активности основных БАС экстрактов, полученные с помощью программы PASS.

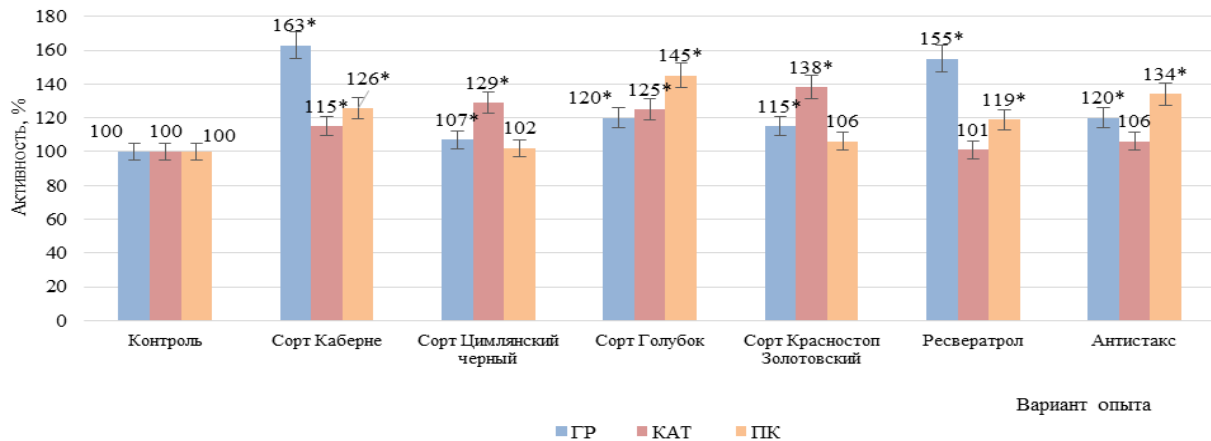


Рисунок 2 – Результаты оценки субстанций из красных листьев винограда культурного, ресвератрола и Антистакс® с использованием вторичной СФБТС на основе ГР, КАТ и ПК. (далее и везде достоверность различий с контролем – $*p < 0,05$, данные выражены в процентах от контроля)

С помощью молекулярного докинга продемонстрировано наиболее вероятное связывание ресвератрола и кверцетина глюкуронида с активными центрами глутатионредуктазы, при этом энергия их связывания составила $-7,40$ и $-9,10$ ккал/моль, соответственно.

Таким образом, подтверждена эффективность сухого экстракта из красных листьев винограда культурного сорта Каберне Совиньон, свидетельствующая о перспективности его использования для дальнейшей разработки лекарственного препарата на его основе.

Достоверность результатов, полученных с помощью СФБТС *in vitro* сравнивали с результатами, полученными с использованием в качестве биотест-систем организменного уровня лабораторных животных (модель острого экссудативного воспаления у мышей, вызываемого введением под апоневроз задних лап флогогенного агента – формалина; модель экспериментального перитонита у крыс, вызываемого внутрибрюшинным введением 0,2%-го раствора азотнокислого серебра; модель повышения сосудистой проницаемости

кожи у мышей; модель интерстициального отека у крыс; модель пролиферативного воспаления («ватная гранулема»); модель определения порога болевой чувствительности у мышей по методике «уксусно-кислые корчи»; модель АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов) на экспериментальных моделях (лабораторные животные: мыши, крысы, кролики). Результаты *in vivo* соответствуют данным, полученным с использованием СФБТС, и в совокупности свидетельствуют о венотропных свойствах данной субстанции из нативного сырья.

3. Испытание вторичной СФБТС для оценки адаптогенных свойств биологически активных соединений

В исследования были включены сухие экстракты травы серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) с содержанием в них 20-гидроксиэкдизона 4%, 7% и 24%. Специфичность и достоверность результатов оценивали в сравнении с лекарственным препаратом Экдистен®, представляющий собой стероидный гормон из корней и корневищ левзеи сафлоровидной.

В соответствии с результатами их анализа в программе PASS была спрогнозирована активность ключевых БАС экстрактов, указанная в Таблице 2. Для выбора из них перспективного объекта для дальнейших исследований с наиболее выраженной адаптогенной активностью применяли комбинацию двух СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы. Снижение активности КАТ и увеличение скорости ГР-реакции коррелирует с наличием у БАС адаптогенных свойств (Патент 2181890, 2002).

Таблица 2 – Результаты прогноза биологической активности БАС экстрактов травы серпухи венценосной (СЭТС)

Наименование объекта	Целевые БАС	Биологическая активность	Pa
Серпухи венценосной травы экстракт сухой	20-гидроксиэкдизон	Ингибитор мембранной проницаемости	0,747
		Иммуностимулирующая	0,723
		Гепатопротекторная	0,647
	α -экдизон	Гепатопротекторная	0,786
		Ингибитор мембранной проницаемости	0,788
		Иммуностимулирующая	0,679

Результаты исследований в опытах *in vitro* представлены на Рисунке 3.

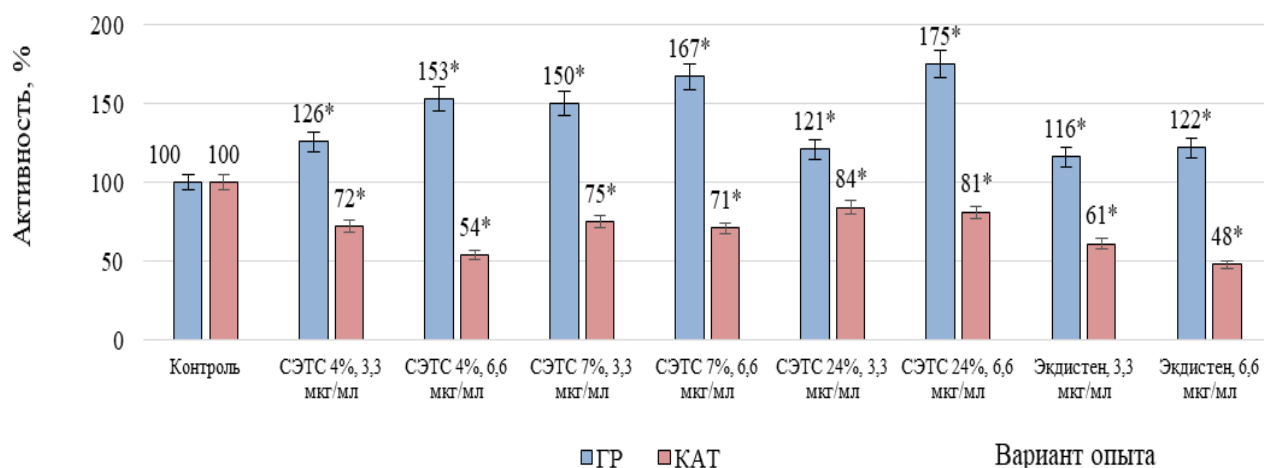


Рисунок 3 – Результаты оценки субстанций из травы серпухи венценосной и Экдистен® с использованием вторичной СФБТС на основе ГР и КАТ

Из представленных данных (Рисунок 3) видно, что образец с содержанием 7% 20-гидроксиэкдизона увеличивал скорость ГР на 67% и снижал скорость КАТ на 29% по сравнению с контролем, что коррелирует с его адаптогенной активностью, которая подтверждена в опытах *in vivo* на экспериментальных моделях.

Как показали результаты молекулярного докинга, ни одно из веществ (Таблица 2) не взаимодействует с cys58 и cys 63 активного центра глутатионредуктазы.

При сравнительном изучении *in vivo* показано, что экстракт проявлял антигипоксическую активность, увеличивая среднее время выживания животных в гермообъеме на 9%, а в дозе 100 мг/кг – на 16%; в дозе 100 мг/кг изучаемый экстракт достоверно увеличивал выносливость на 20%, а работоспособность на 38% по сравнению с контролем. Он не оказывал отрицательного влияния на нервную систему и поведение лабораторных животных на модели «открытое поле норкового типа», что коррелирует с выявленными с помощью СФБТС данными о наличии у экстракта адаптогенных свойств.

4. Испытание первичной СФБТС для оценки дофаминергических свойств биологически активных соединений

Исследования проводили на примере сухих экстрактов плодов витекса священного (*Vitex agnus-castus* L.) и витекса китайского (*Vitex negundo* L.). Специфичность и достоверность полученных *in vitro* данных изучали в сравнении со стандартным образцом агнузида, дофамином (природным ретроингибитором ТГ и агонистом дофаминовых рецепторов) и лекарственным препаратом Циклоденон®.

Физико-химическими методами установлено, что в плодах витекса священного в отличие от витекса китайского содержатся кастицин и 6'-О-п-гидроксibenзоилмусаенозидная кислота. Целевыми БАС в экстрактах являются агнузид и лютеолин-7-глюкозид, которые в программе PASS показали, что лютеолин-7-глюкозид способен усиливать нейротрофические факторы ($P_a = 0,674$), проявлять активность при различных формах фобии ($P_a = 0,544$), может обладать кровоостанавливающим действием ($P_a = 0,673$). Для агнузида возможны антитромбическая ($P_a = 0,736$), антиоксидантная ($P_a = 0,788$) и анальгезирующая ($P_a = 0,730$) активность.

Наличие или отсутствие центрального дофаминергического действия исследуемых субстанций оценивали с помощью СФБТС на основе тирозингидроксилазы, которая является лимитирующим звеном дофаминовой нейромедиаторной системы и играет важную роль в нейрогуморальной регуляции обмена веществ, в том числе в нейроэндокринной регуляции лактации.

На Рисунке 4 представлены результаты определения *in vitro* скорости тирозингидроксилазной реакции в присутствии экстрактов, индивидуальных веществ агнузида и дофамина и лекарственного препарата Циклодинон®.

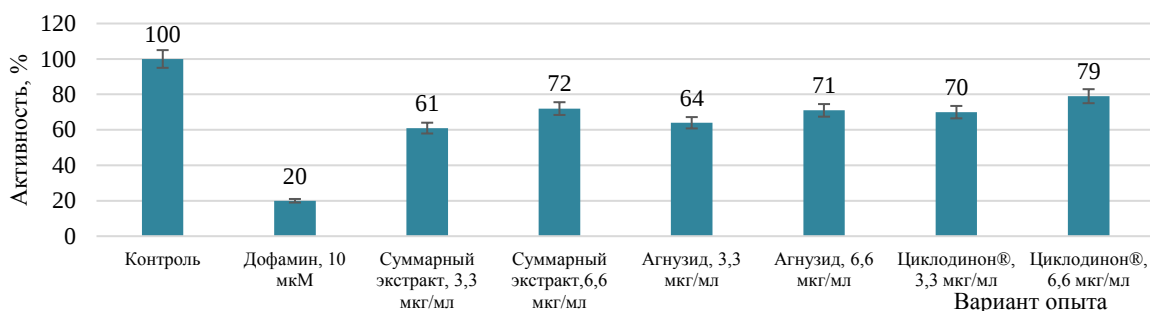


Рисунок 4 – Результаты оценки субстанций из плодов витекса священного и витекса китайского, агнузида и Циклодинон® с использованием первичной СФБТС на основе ТГ

Из Рисунка 4 видно, что сухой экстракт плодов витекса священного и препарат Циклодинон® обладали сопоставимой дофаминергической активностью в условиях проведенного эксперимента. Сухой экстракт плодов витекса китайского не проявлял дофаминергическую активность, следовательно, он не может быть использован для получения лекарственных средств наряду с плодами витекса священного, что подтверждает недопустимость его примеси в плодах витекса священного в соответствии с требованиями зарубежных фармакопей (ЕР, ВР, АНР и др.).

4. Испытание вторичной СФБТС для оценки адаптогенных свойств на примере культур клеток лекарственных растений

Основными действующими компонентами сухого экстракта суспензионной культуры женьшеня обыкновенного являются тритерпеновый гликозид панаксозид Rg1, а сухого экстракта суспензионной культуры родиолы розовой – розавин, биологическая активность которых по Программе PASS прогнозируется в значениях: при деменции Ра 0,900, 0,540 и 0,527; для антимикробной активности – 0,801, 0,538 и 0,699; для иммуностимулирующей – 0,856, 0,474 и 0,687, соответственно. Все указанные виды активности характерны для биологически активных соединений, повышающих неспецифическую сопротивляемость организма к негативным воздействиям окружающей среды.

Для выявления спрогнозированной адаптогенной активности исследуемых объектов применяли вторичную СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы. Результаты представлены на Рисунке 5.

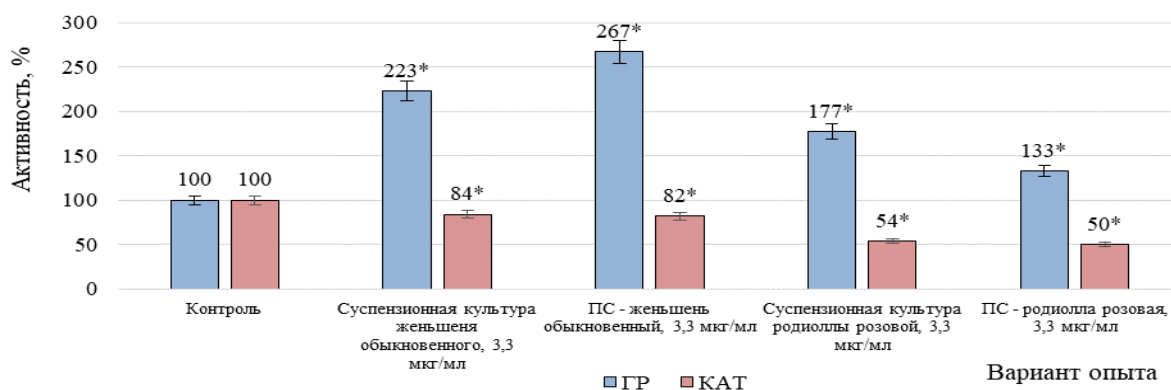


Рисунок 5 – Результаты оценки субстанций из нативного и биотехнологического сырья женьшеня обыкновенного и родиолы розовой с использованием вторичной СФБТС на основе ГР, КАТ

Исходя из представленных результатов видно, что оба исследуемых объекта ускоряли глутатионредуктазную реакцию и снижали скорость каталазной реакции, что коррелирует с наличием у образцов адаптогенной активности. Более выраженное влияние на активность ферментов проявил сухой экстракт суспензионной культуры женьшеня обыкновенного в дозе 6,6 мкг/мл и родиолы розовой в дозе 3,3 мкг/мл, что свидетельствует об их перспективности в качестве биотехнологического сырья для препаратов адаптогенного действия.

В соответствии с результатами молекулярного докинга – гинзенозиды культур клеток женьшеня обыкновенного имеют высокую энергию связывания в альтернативном сайте ГР, что, вероятно, обеспечивает их адаптогенное действие.

Для подтверждения результатов, полученных с использованием СФБТС *in vitro*, их сравнивали с результатами *in vivo* в стандартном тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией. Оба экстракта увеличивали среднее время выживания животных в гермообъеме: культуры клеток женьшеня обыкновенного на 27%, родиолы розовой – на 36% по сравнению с контрольной группой животных, что подтверждает их адаптогенную активность. В тесте «Вынужденное плавание с грузом» показано, что оба экстракта оказывали достоверное положительное влияние на работоспособность и выносливость лабораторных животных. Таким образом, СФБТС показали свою эффективность и перспективность при оценке БАС, полученных не только из нативного, но и из биотехнологического сырья.

6. Испытание вторичной СФБТС для оценки гепатопротективных свойств биологически активных соединений

Исследования проводили на примере субстанций из дикорастущего (травы) и культивируемого (листья) цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.). В Программе PASS проанализированы доминирующие компоненты экстрактов (цикориин, хлорогеновая и цикориевая кислоты) и спрогнозирована их антиоксидантная (Ра 0,837; 0,785; 0,746), противогипоксическая (Ра 0,442; 0,726; 0,889) активность, а также их влияние на целостность мембран (Ра 0,901; 0,940; 0,966), что свидетельствует об их возможном гепатопротективном действии. Для его выявления использовали различные вторичные СФБТС:

– на основе глутатионредуктазы и каталазы, а также iNO-синтазы для выявления противовоспалительной и антиоксидантной активности, играющие важную роль в механизме гепатопротективного действия;

– на основе цитохрома Р450 и глутатионтрансферазы для выявления антитоксических свойств БАС. Для оценки специфичности и достоверности результаты сравнивали с известным гепатопротекторным средством растительного происхождения Силимар®.

Результаты представлены на Рисунке 6.

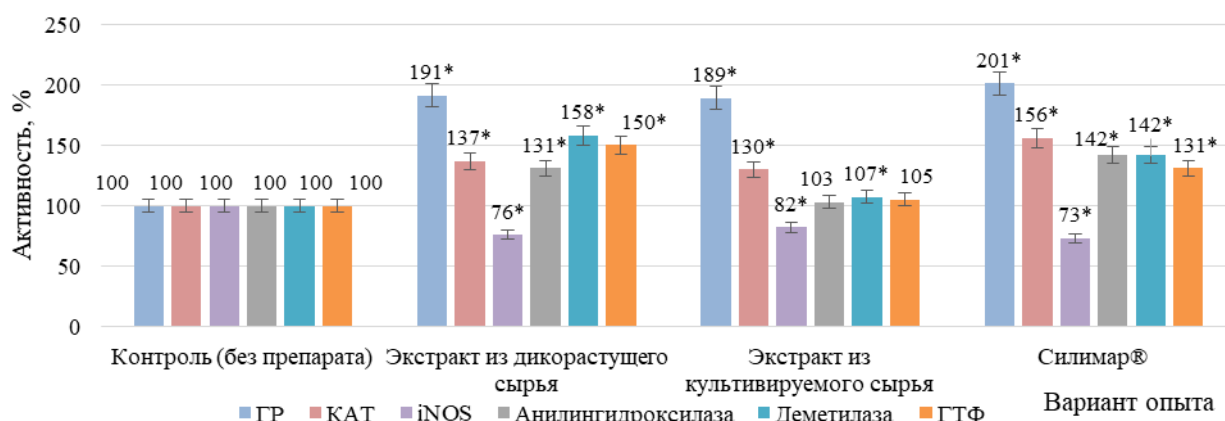


Рисунок 6 – Результаты оценки субстанций из дикорастущего и культивируемого сырья цикория обыкновенного и Силимар® с использованием вторичной СФБТС на основе ГР, КАТ и iNOS, а также цитР450 и ГТФ

Показано, что перспективным объектом для дальнейших исследований для создания гепатопротекторного средства на его основе является экстракт из сырья дикорастущего растения.

Полученные с помощью СФБТС результаты согласуются с результатами с использованием биотест-систем организменного уровня: противовоспалительная активность – на модели формалинового и каррагенинового отека в сравнении с субстанцией калефлон, известным противовоспалительным средством из цветков календулы лекарственной.

Установлено, что экстракт в дозе 100 мг/кг оказывал достоверно выраженное противовоспалительное действие, угнетая отек, вызванный формалином на 45%, каррагенином – на 37% по отношению к контролю. Антиоксидантная активность подтверждена на модели перекисного и осмотического гемолиза в сравнении с аскорбиновой кислотой. Показано, что концентрация экстракта, вызывающая 50%-е ингибирование процесса перекисного гемолиза эритроцитов, составила 0,11 мкг/мл.

Кроме того, экстракт при взаимодействии с плазматической мембраной эритроцитов способствовал снижению ее проницаемости в гипотонических условиях, что выражалось в снижении интенсивности осмотического гемолиза ($IC_{50} = 0,042$ мкг/мл).

На модели токсического поражения печени, вызванного тетрахлорметаном установлено, что в сыворотке крови крыс по сравнению с аналогичными показателями у животных с нелеченым экспериментальным гепатитом, профилактическое введение экстракта в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг приводило к дозозависимому снижению активности АЛТ на 35% и 45%, АСТ на 15% и 28%, ЩФ на 15% и 21%; содержания общего билирубина – на 20% и 29%, соответственно. Биохимические показатели крови крыс, получавших экстракт в дозе 500 мг/кг, были ниже, чем у крыс, получавших 100 мг/кг препарата сравнения (Силимар®).

Введение крысам сухого экстракта листьев цикория обыкновенного в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг на фоне токсического гепатита, вызванного тетрахлорметаном, незначительно снижало активность АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, содержание общего билирубина, что свидетельствует об его неэффективности при данной патологии.

Изучение морфологического строения образцов из печени крыс групп, получавших экстракт из культивируемого сырья, выявило изменения по типу гиалиново-капельной и жировой дистрофии

Оценивая морфологическую структуру печени крыс, получавших экстракт из дикорастущего сырья, установлено, что он проявлял гепатопротективную активность.

Таким образом, результаты, полученные с применением молекулярных ферментных биотест-систем, согласуются с данными, полученными на организменном уровне при использовании в качестве тест-объектов лабораторных животных: сухой экстракт цикория травы обыкновенного обладает гепатопротективной активностью в условиях модели тетрахлорметанового гепатита, что подтверждается гистологическими исследованиями.

СФБТС также целесообразно использовать для углубленного изучения и для поиска маркеров для стандартизации субстанции – в выбранном экстракте использованы его фракции: бутанольная, спиртовая, этилацетатная и водная. С помощью СФБТС на основе цитохрома P450 и глутатионтрансферазы исследовали их антитоксическую активность (Таблица 3).

Таблица 3 – Результаты оценки фракций экстракта травы цикория обыкновенного с использованием вторичной СФБТС на основе цитP450 и ГТФ

Вариант опыта	Скорость реакций, цит P ₄₅₀ , М ± m				Скорость реакций, глутатионтрансфераза, М ± m	
	Анилингидроксилаза		Деметилаза			
	нмоль/мин·мг белка	%	нмоль/мин·мг белка	%	нмоль/мин·мг белка	%
Контроль	1,93±0,33	100	2,25±0,43	100	340,3±1,46	100
Спиртовая фракция	2,22±0,30*	115	2,50±0,5*	111	346,8±1,39*	102
Этилацетатная фракция	2,25±0,31*	116	2,52±0,4	112	363,9±1,32*	107
Бутанольная фракция	3,62±0,38*	187	4,56±0,2*	203	400,7±1,46*	118
Водная фракция	3,05±0,39*	156	5,22±0,1*	232	395,8±1,36*	116
Силимар®	2,60±0,57*	135	3,19±0,3*	142	483,2±1,30*	142

Установлено, что водная и бутанольная фракции обладали выраженным влиянием на активность ферментов биотрансформации цитР450 и ГТФ, что доказывает детоксицирующую активность образцов. Результаты были подтверждены на модели тетрахлорметанового гепатита (Таблица 4).

Таблица 4 – Результаты изучения влияния фракций травы цикория обыкновенного на биохимические показатели сыворотки крови крыс с интоксикацией CCl_4 ($M \pm m$)

Группы крыс, n = 8	АСТ, U/л	АЛТ, U/л	ЩФ, U/л	Билирубин общ, мкмоль/л	Глюкоза, ммоль/л	Холестерин , ммоль/л
Интактные	96,8±6,5	55,9±5,0	393,2±3,5	2,4±0,26	5,3±0,46	1,9±0,14
Контрольные (CCl_4 гепатит)	143,9±12,0 ⁺	111,0±6,4 ⁺	545,6±8,1 ⁺	2,8±0,03 ⁺	4,4±0,08 ⁺	0,66±0,07 ⁺
СП, 100 мг/кг	134,8±2,1*	84,2±2,9*	543,2±4,8*	2,46±0,08*	4,5±0,36	0,74±0,07*
ЭА, 100 мг/кг	129,2±3,1*	93,1±1,7*	484,0±6,9*	2,4±0,4*	4,6±0,08*	0,79±0,08*
БУ, 100 мг/кг	117,8±2,4*	74,1±1,7*	452,0±6,8*	2,5±0,06*	5,1±0,13*	0,77±0,02*
ВО, 100 мг/кг	114,5±4,5*	65,6±3,1*	481,0±16,2*	2,4±0,03*	4,8±0,08*	0,85±0,02*
Силимар [®] , 100 мг/кг	113,70±3,9*	65,6±1,23*	479,0±8,8*	2,34±0,08*	4,88±0,03*	0,92±0,04*

Введение водной фракции животным в дозе 100 мг/кг приводило к уменьшению дистрофических изменений гепатоцитов. При введении крысам бутанольной фракции экстракта в дозе 100 мг/кг в гепатоцитах наблюдались изменения по типу гиалиново-капельной и жировой дистрофии. Таким образом, на основании полученных результатов для дальнейших исследований выбрана водная фракция, содержащая гидроксикоричные кислоты: цикориевую (3,98±0,16%) и хлорогеновую (0,40±0,02%).

В результате проведенных исследований с помощью PASS и PharmaExpert прогнозируются четыре механизма гепатопротективного действия: для цикориевой кислоты, взаимодействие с ГТФ А (Глутатион-S-трансфераза А) и ГТФ P1-1 (Глутатион-S-трансфераза А) в качестве субстрата, с оценками P_a - P_i равными 0,82 и 0,61, соответственно; для хлорогеновой кислоты – с ГТФ А и изоформой цитР450 – CYP2C9 в качестве субстрата, с оценками P_a - P_i равными 0,57 и 0,67, соответственно.

Поэтому изучали прямое влияние гидроксикоричных кислот на активность цитР450 и ГТФ с использованием СФБТС на основе данных ферментов (Таблица 5).

Таблица 5 – Результаты оценки цикориевой и хлорогеновой кислот с использованием СФБТС на основе цитР450 и ГТФ *in vitro*

Вариант опыта	Скорость реакций, цит Р ₄₅₀ , М±m				Скорость реакций, глутатионтрансфераза, М± m	
	Анилингидроксилаза		Деметилаза			
	нМОЛЬ/МИН·МГ белка	%	нМОЛЬ/МИН·МГ белка	%	нМОЛЬ/МИН·МГ белка	%
Контроль	3,54±0,38	100	4,91±0,21	100	284,7±0,85	100
Цикориевая кислота	4,74±0,40*	134	8,04±0,56*	164	409,7±0,36*	144
Хлорогеновая кислота	4,42±0,36*	125	14,15±1,0*	288	368,03±1,2*	129
Силимар®	4,35±0,57*	123	6,73±0,3*	137	398,6±1,30*	140

Оценка активности экстракта травы цикория обыкновенного с использованием СФБТС на основе цитР450 и ГТФ позволяет перейти к выявлению одного из возможных механизмов его гепатопротективного действия, так как изменение скорости ферментативной реакции в присутствии БАС может говорить об их связывании с данными ферментами. Для иллюстрации полученных результатов провели молекулярный докинг в отношении цитР450 (изоформа CYP3A4) и ГТФ (изоформа MGST1).

Цикориевая кислота образует водородные связи с гемовой частью фермента и с остатками аминокислот за счет -ОН групп в бензольных кольцах лигандов (Рисунок 7).

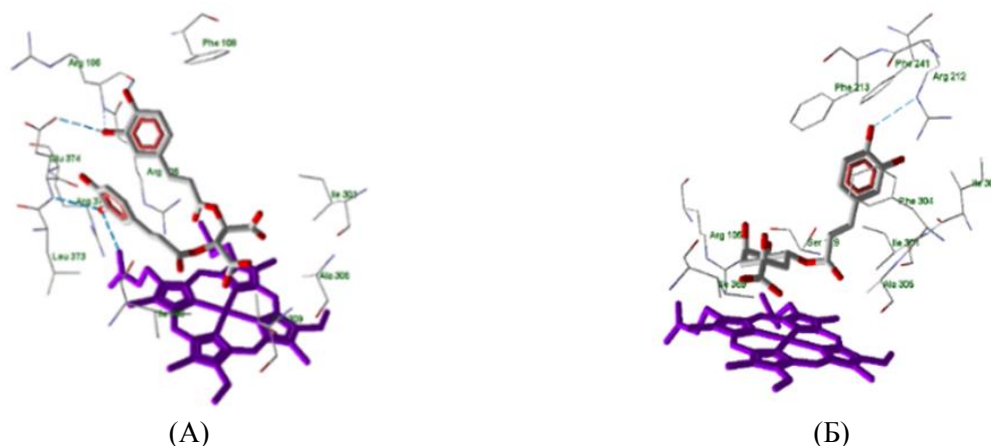


Рисунок 7 – Конформации цикориевой (А) и хлорогеновой (Б) кислот в сайте связывания цитохрома Р450 (изоформа CYP3A4), полученные в результате

докинга с использованием структуры PDB 6UNJ. Атомы водорода скрыты. Показаны гемовая часть фермента (выделена сиреневым) и аминокислотные остатки в пределах 3 Å от лиганда. Водородные связи изображены синими пунктирными линиями

Докинг цикориевой и хлорогеновой кислот в глутатионтрансферазу MGST1 (в сайт связывания глутатиона) позволил получить наилучшие конформации, показанные на рисунке 7, и подтверждающие наличие у них антитоксической активности.

Полученные *in silico*, *in vitro* и *in vivo* данные свидетельствуют о взаимодействии цикориевой и хлорогеновой кислот с цитР450 и ГТФ.

Таким образом, результаты, полученные с использованием двух разных сочетаний СФБТС позволили выбрать перспективный по эффективности сухой экстракт травы цикория обыкновенного, обладающий гепатопротективной активностью, что продемонстрировано результатами молекулярного докинга и подтверждено исследованиями с использованием лабораторных животных. Полученные данные позволяют использовать его в фармацевтической разработке.

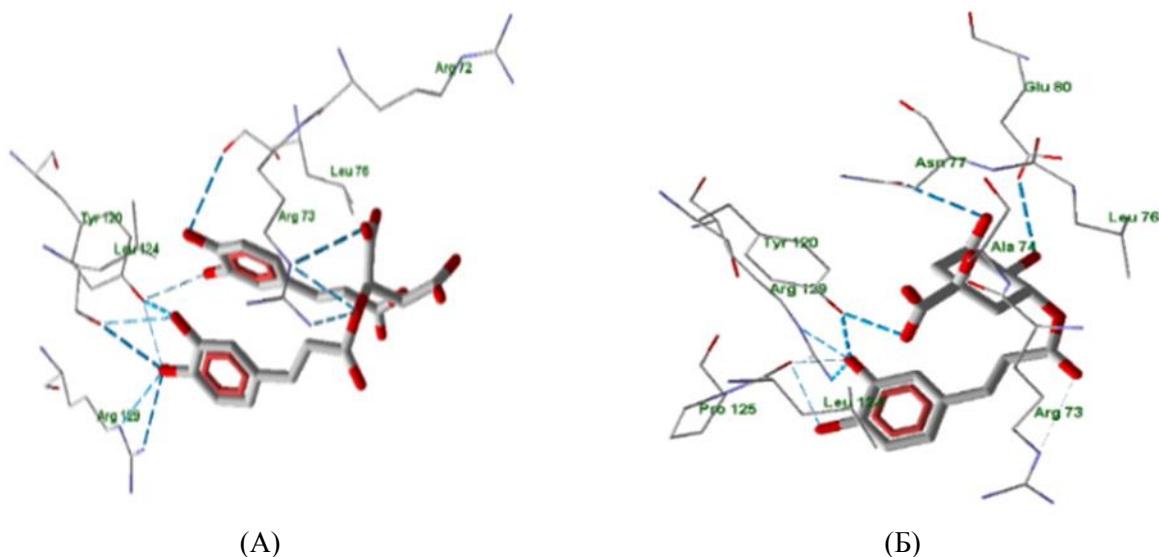


Рисунок 8 – Конформации цикориевой (А) и хлорогеновой (Б) кислот в сайте связывания глутатионтрансферазы (изоформа MGST1), полученные в результате докинга с использованием структуры PDB 2H8A. Атомы водорода скрыты. Показаны аминокислотные остатки в пределах 3 Å от лиганда. Водородные связи изображены синими пунктирными линиями

7. Испытания первичной СФБТС для оценки иммуномодулирующих свойств биологически активных соединений

Сравнительную оценку иммуномодулирующей активности субстанций из травы дикорастущего и листьев культивируемого цикория обыкновенного проводили с применением первичной СФБТС на основе НАДФН-оксидазы, ключевого фермента терминальной стадии фагоцитоза. Результаты представлены на Рисунке 9.



Рисунок 9 – Результаты оценки субстанций из дикорастущего и культивируемого сырья цикория обыкновенного с использованием первичной СФБТС на основе НАДФН-оксидазы, выраженную в процентах от контроля

В спокойных (не стимулированных) лейкоцитах НАДФН-оксидаза не активна. При добавлении к гомогенату спокойных лейкоцитов иммуномодулятора, НАДФН-оксидаза активируется. Для сравнительной количественной оценки влияния изучаемых экстрактов на активность НАДФН-оксидазы *in vitro*, соотносили скорости реакций, полученные в упомянутых пробах, со скоростью НАДФН-оксидазной реакции в пробе, содержавшей известный природный иммуноактиватор протимозина- α , принимая ее за 100%.

В контрольной пробе, не содержащей БАС, скорость НАДФН-оксидазной реакции равна 0. При добавлении в пробу, к гомогенату спокойных лейкоцитов, протимозина- α наблюдали активацию НАДФН-оксидазы: НАДФН окислялся со скоростью 28,3 нмоль/мин на 10 мкл гомогената, что принимали за 100%. При добавлении экстракта травы цикория в инкубационную среду происходила активация НАДФН-оксидазы. Эффект экстракта листьев цикория был более выраженным – он увеличивал скорость НАДФН-оксидазной реакции на 69% (Рисунок 9).

С использованием первичной СФБТС на основе НАДФН-оксидазы в опытах *in vitro* установлены количественные различия двух экстрактов из дикорастущего и культивируемого: влияние экстракта из культивируемого растения на скорость ферментативной реакции было более выражено, чем экстракта из дикорастущего сырья. В связи с чем экстракт листьев цикория обыкновенного является более перспективным источником БАС иммуномодулирующего действия.

Полученные с помощью НАДФН-оксидазной СФБТС результаты для обоих экстрактов цикория сравнивали с результатами, полученными с использованием биотест-систем организменного уровня. Показана эффективность по отношению к реакциям клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа при экспериментальном иммунодефиците (Патент № 2710270, 2019), при этом эффект БАС цикория обыкновенного листьев экстракта сухого был выше, чем экстракта травы дикорастущего растения.

8. Испытания вторичной СФБТС для оценки эффективности настоек из растительного лекарственного сырья в эксперименте

В работе использовали экспериментальные спиртосодержащие настойки из лекарственного растительного сырья (ЭЛФ), отличающиеся от стандартных пониженным содержанием экстрагента. Активность целевых БАС настоек проанализировали с помощью Программы PASS. Результаты представлены в Таблице 7.

Таблица 7 – Результаты прогноза фармакологической активности ЭЛФ

Наименование объекта	Целевые БАС	Биологическая активность	Pa
Настойка пустырника	Гарпагида ацетат	Антиоксидантная Противовоспалительная Аналептическая	0,931 0,739 0,560
	Аюгол	Аналептическая Антимикробная	0,743 0,657
Настойка валерианы	Изовалереновая кислота	При разных формах фобии Антагонист нейротрансмиттеров	0,972 0,628

Спрогнозированные виды биологической активности свидетельствуют о наличии адаптогенных, антиоксидантных и противомикробных свойств, которые оценивали с помощью соответствующих СФБТС *in vitro*. Результаты представлены на Рисунке 10.

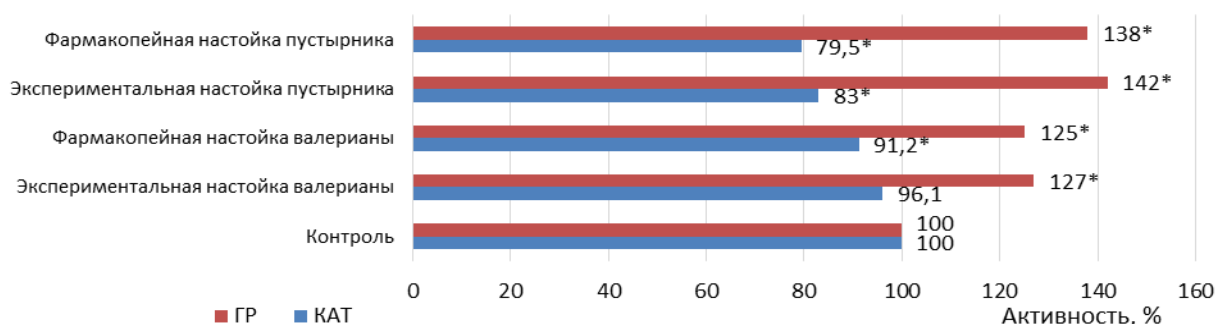


Рисунок 10 – Результаты оценки ЭЛФ с использованием вторичной СФБТС на основе КАТ и ГР, выраженную в процентах от контроля

Согласно полученным с помощью СФБТС результатам, влияние, оказываемое экспериментальными настояками на активность ферментов, при снижении концентрации спирта этилового при их получении, сохраняется по сравнению с реализуемыми фармакопейными настояками.

Также проводили оценку биологической активности ЭЛФ в сравнении с фармакопейными настояками с использованием тест-систем организменного уровня в стандартных тестах гипоксической гипоксии с гиперкапнией и хлоралгидратного сна (Таблица 8).

Таблица 8 – Результаты исследований экспериментальных настоек в опытах *in vivo*

Группы животных n = 10	Время латентного периода (с)	Время сна (мин)	Время выживания мышей в гермообъеме (с)
Контроль	126,5±7,08	183,4±2,49	620±29,8
Экспериментальная настойка валерианы	58,0±1,00*	207,3±3,13*	761±35,9*
Фармакопейная настойка валерианы	63,0±1,60*	207,8±3,65*	770±13,4*
Экспериментальная настойка пустырника	55,5±1,50*	233,7±2,68*	771±35,4*
Фармакопейная настойка пустырника	56,5±2,50*	233,6±5,08*	775±12,5*

По результатам проведенного эксперимента установлено, что исследуемые объекты сохраняют свое основное фармакологическое действие, несмотря на снижение концентрации спирта этилового, а также увеличивают среднее время выживания животных в гермообъеме.

Таким образом, СФБТС эффективны не только на этапе скрининга БАС и фармацевтической разработки лекарственных растительных средств, но и при хранении лекарственных форм для подтверждения сохранения их качества и эффективности.

9. Испытания вторичной СФБТС для оценки эффективности таблеток с жидким растительным экстрактом в эксперименте

С использованием Программы PASS оценивали возможную биологическую активность для биологически активных соединений комплексного жидкого растительного экстракта, состоящего из экстрактов цветков ромашки аптечной, цветков календулы лекарственной, травы тысячелистника обыкновенного (Таблица 9).

Таблица 9 – Результаты прогноза фармакологической активности БАС комплексного жидкого растительного экстракта

Наименование объекта	Целевые БАС	Биологическая активность	Pa
Экстракт ромашки	Апигенин	Антиоксидантная	0,794
		Противовоспалительная	0,660
		Антимикробная	0,594
	Космосиин	Противовоспалительная Противогрибковая Противомикробная	0,718 0,763 0,595
Экстракт календулы	Кариофиллен	Противовоспалительная	0,745
		При дерматологических патологиях	0,734
	Календулозиды	Противовоспалительная Антимикробная	0,836 0,538
Экстракт тысячелистника	Лютеолин	Противовоспалительная	0,661
		Антимикробная	0,710
	Тимол	Антимикробная	0,913

Спрогнозированную *in silico* антимикробную активность исходного комплексного экстракта и разработанных на его основе таблеток изучали с

помощью вторичной СФБТС на основе каталазы и глутатионтрансферазы (Рисунок 11).

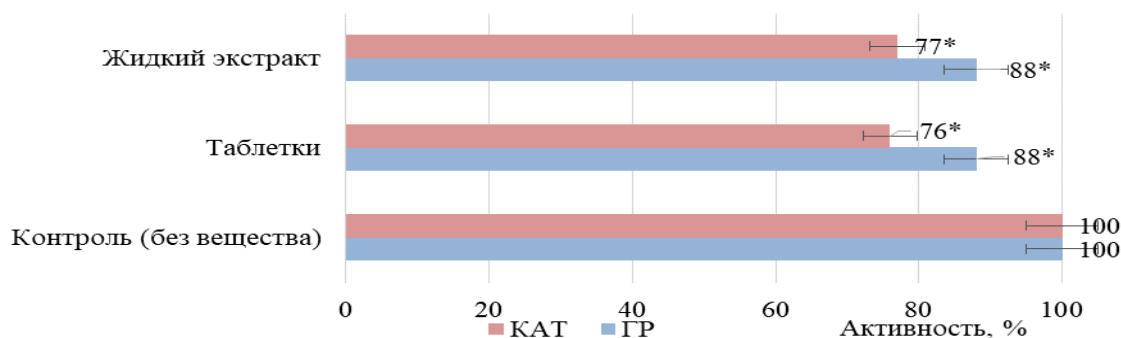


Рисунок 11 – Результаты оценки жидкого комбинированного экстракта и таблеток на его основе с использованием вторичной СФБТС на основе КАТ и ГР, выраженную в процентах от контроля

Полученные результаты показывают, что в таблетках при хранении сохранилась антимикробная активность исходного комплексного растительного экстракта.

Полученные *in vitro* данные дополнительно сравнивали с данными микробиологических исследований в отношении Грам(+) и Грам(-) микроорганизмов (Таблица 10).

Таблица 10 – Антимикробная активность комплексного жидкого экстракта и таблеток на его основе

Объект исследования	<i>Staphylococcus aureus</i> 209 P	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6896	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Microsporum canis</i> 352
	Антимикробная активность (разведение)					
Жидкий экстракт	1:160–1:200	1:20	1:20	1:10	1:10	1:80
Таблетки	1:80–1:160	1:20	1:20	1:10	1:10	част. 1:80

Таким образом, полученные с помощью СФБТС данные коррелируются с данными биотест-систем микроорганизменного уровня, и

СФБТС подтверждают свою эффективность и при расширении линейки растительных лекарственных средств.

10. Испытания вторичной СФБТС для оценки эффективности спрея и таблеток с растительными экстрактами в эксперименте

Доминирующими компонентами в Эвкалимине (средство, полученное из листьев и побегов эвкалипта прутовидного) являются фенолоальдегиды дитерпеновой природы, а в Эстифане (сухой экстракт травы эхинацеи пурпурной) – производные гидроксикоричных кислот и изобутиламиды, проанализированные в Программе PASS (Таблица 11).

Таблица 11 – Результаты прогноза биологической активности экстрактов «Эвкалимин» и «Эстифан»

Наименование объекта	Целевые БАС	Биологическая активность	Pa
«Эвкалимин»	Эвкалимин	Антиоксидантная	0,931
		Противовоспалительная	0,739
	Кариофиллен	Противовоспалительная При кожных патологиях	0,745 0,734
«Эстифан»	Цикориевая кислота	Противомикробная	0,790
		Антиоксидантная	0,746
	Эхинацин	Стимулирует выработку макрофагов	0,838

Антимикробную и иммуномодулирующую активность экстрактов, а также лекарственных форм на их основе установили с помощью СФБТС на основе КАТ, ГР и НАДФН-оксидазы в сравнении с ЛП Эвкалимин® и Эстифан (Рисунок 13).

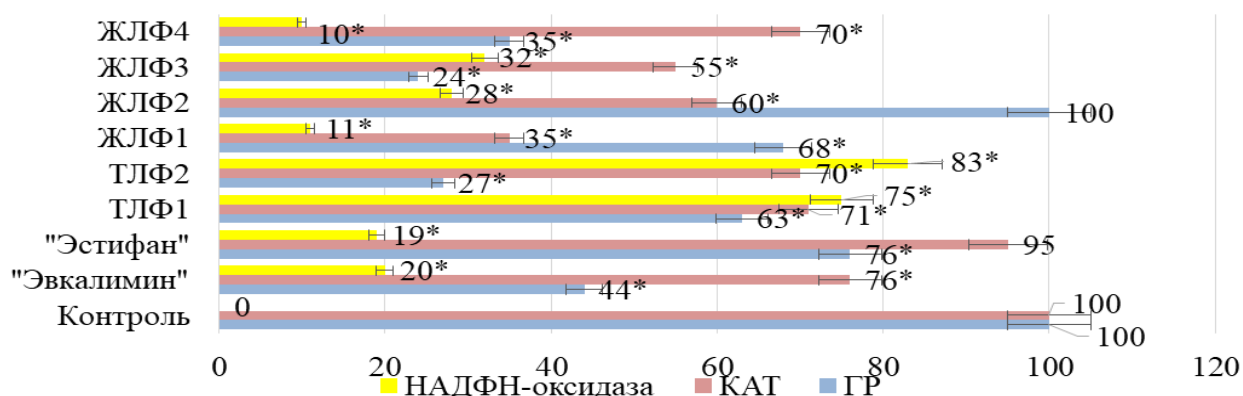


Рисунок 13 – Результаты оценки растительных экстрактов и ЭЛФ на их основе с использованием вторичной СФБТС на основе КАТ и ГР и НАДФН-оксидазы, выраженную в процентах от контроля

Результаты, представленные на Рисунке 13, показывают, что в ЭЛФ сохраняется биологическая активность исходных компонентов, что дополнительно подтверждено исследованиями на патогенных бактериях *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P), *Proteus vulgaris* ATCC 6896 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Таким образом, использование СФБТС целесообразно, так как они подтвердили качество и эффективность ЭЛФ.

Сравнительный анализ экономической эффективности применения СФБТС (молекулярный уровень) и лабораторных животных (организменный уровень) для оценки БАС

Сравнительные расчеты по затратам при оценке БАС с использованием биотест-систем молекулярного уровня (СФБТС) и организменного уровня (экспериментальные модели на лабораторных животных) проводили на примере 3 сухих экстрактов травы серпухи венценосной с различным содержанием фитоэкдистероидов и 4 сухих экстрактов красных листьев винограда культурного различных сортов. Полученные результаты показали, что использование СФБТС позволяет сократить временные и финансовые затраты, а также количество лабораторных животных (Таблица 12).

Таблица 12 – Финансовые затраты на выполнение исследований

№	Наименование затрат	Сумма затрат, руб. (<i>in vivo</i>)	Доля в сумме затрат, % (<i>in vivo</i>)	Сумма затрат, руб. (СФБТС)	Доля в сумме затрат, % (СФБТС)
1	2	3	4	5	6
Оценка адаптогенной активности экстрактов травы серпухи венценосной					
1.	Сырье и материалы	346 644,00	63,4	47062,72	64,6
2.	Энергозатраты	529,38	0,1	890,01	1,2
3.	Заработная плата с начислениями	66 465,00	12,2	8316,00	11,4
4.	Накладные расходы	132 930,00	24,3	16632,00	22,8

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5	6
Всего:		546 568,48	100	72 900,73	100
Оценка венотропной активности экстрактов красных листьев винограда культурного					
1.	Сырье и материалы	2 067 947,86	88,80	53476,04	66,10
2.	Энергозатраты	21 635,90	0,93	2 478,77	3,06
3.	Заработная плата с начислениями	79 758,00	3,42	8316,00	10,28
4.	Накладные расходы	159 516,00	6,85	16632,00	20,56
Всего:		2 328 857,76	100	80 902,81	100

Использование СФБТС при оценке адаптогенной активности экстрактов серпухи венценосной позволяет сократить временные затраты в 3 раза, финансовые – в 4,4 раза, количество лабораторных животных – в 3 раза; а при оценке венотропной активности экстрактов винограда временные затраты сокращаются в 6 раза, финансовые – в 27 раз, количество лабораторных животных – в 7 раза, что реализует концепцию «трех R».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании результатов информационно-аналитического обзора и прогнозирования биологической активности соединений *in silico* в качестве тест-объектов были выбраны ключевые / лимитирующие ферменты гомеостаза и на их основе сформированы СФБТС, являющиеся адекватным инструментом по сравнению с традиционно используемыми тест-системами организменного уровня (лабораторные животные). В методологическом отношении существенными характеристиками ферментных биотест-систем являются их высокая специфичность и чувствительность, хорошая воспроизводимость и значительная экономичность.

Функциональные возможности СФБТС (Рисунок 14) широкие, в работе продемонстрировано их использование для оценки БАС на разных этапах: для оптимизации процесса выделения БАС из растительного сырья, выявления маркерных соединений при его стандартизации, в процессе фармацевтической

разработки лекарственных средств на их основе, для оценки качества биотехнологического сырья и др.



Рисунок 14 – Функциональные возможности специфических ферментных биотест-систем *in vitro*

Результаты диссертационного исследования показывают, что применение СФБТС целесообразно при оценке биологически активных соединений различного происхождения и агрегатного состояния для дальнейшего их использования в пищевых, медицинских, ветеринарных и других целях.

Рекомендации

При использовании СФБТС для оценки биологически активных соединений необходимо учитывать, что каждая биотест-система позволяет оценить исследуемый объект по одному биологическому параметру. Поэтому для выявления спектра биологически активных свойств, следует применять соответствующие первичные и вторичные специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, каждая из которых коррелирует с определенным видом биологической активности.

Применение СФБТС на основе некоторых ключевых ферментов гомеостаза апробировано на экспериментальных образцах растительных субстанций и лекарственных форм, полученных в ФГБНУ ВИЛАР, стандартных образцах, зарегистрированных препаратах, находящихся на реализации, и могут

быть использованы при оценке других объектов с аналогичной биологической активностью.

Общие выводы

1. По результатам проведенных *in silico* (программа PASS), *in vitro* (специфические ферментные биотест-системы) и *in vivo* (экспериментальные модели с использованием лабораторных животных) исследований разработана методология как формирования, так и применения специфических ферментных биотест-систем *in vitro*.

2. Выбраны и охарактеризованы ключевые / лимитирующие ферменты гомеостаза с использованием методов *in silico* в качестве тест-объектов; на их основе сформированы первичные и, представляющие собой сочетание первичных – вторичные, специфические ферментные биотест-системы для оценки биологически активных соединений различного происхождения и агрегатного состояния в условиях опытов *in vitro*.

3. Сформированы и утверждены Реестр Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* и Положение о них, а также разработана и утверждена нормативная документация, касающаяся хранения, пополнения и контроля качества единиц хранения Биологической коллекции, а также ее использования.

4. В результате проведенного комплекса исследований при сравнительном изучении результативности СФБТС и биотест-систем организменного уровня (экспериментальные модели с использованием лабораторных животных: острого экссудативного воспаления у мышей и крыс, «ватной гранулемы» у крыс, повышения сосудистой проницаемости кожи кроликов, экспериментального перитонита у крыс, АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов, оценки влияния на выживаемость мышей в стандартном тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией, оценки влияния на сон мышей по стандартной методике с использованием хлоралгидрата, открытое поле норкового типа, гепатита, вызываемого 4-х дневным внутрижелудочным введением крысам тетрациклина / однократным подкожным введением масляного раствора четыреххлористого

углерода), экспериментально подтверждены приемлемость, достоверность и специфичность первичных и вторичных специфических ферментных биотест-систем на примере препаратов, разработанных в ФГБНУ ВИЛАР.

5. Проведены сравнительные исследования с использованием молекулярных ферментных биотест-систем и биотест-систем организменного уровня (лабораторные животные), показано сокращение затрат при испытаниях на примере экстрактов травы серпухи венценосной: временных – в 3 раза; финансовых – в 4,4 раза; количества лабораторных животных – в 3 раза; экстрактов красных листьев винограда культурного: временных – в 6 раз, финансовых – в 27 раз, количества лабораторных животных – в 7 раз.

6. Разработаны и утверждены: «Методические рекомендации применения СФБТС *in vitro* при исследовании биологической активности растительных объектов» и Стандартные операционные процедуры на определение биологической активности соединений с использованием первичных и вторичных специфических ферментных биотест-систем.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Биотестирование в экспериментальной фармакологии: применение специфических ферментных биотест-систем *in vitro* / И. А. Лупанова, Л. Б. Стрелкова, Е. В. Ферубко, В. К. Колхир // **Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.** – 2013. – № 1. – С. 37–40.
2. Ферубко, Е. В. Специфические ферментные биотест-системы как инструмент фармакологического скрининга / Е. В. Ферубко, И. А. Лупанова, В. К. Колхир // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2013. – № 5. – С. 46.
3. Изучение биологической активности экстракта красных листьев винограда в условиях опытов *in vitro* / И. А. Лупанова, Е. В. Ферубко, В. К. Колхир, Т. А. Сокольская // Человек и лекарство. Сборник материалов конгресса. Тезисы докладов. ЗАО РИЦ «Человек и лекарство». 2013. С. 376–377.

4. Исследование биологической активности винограда культурного листьев красных экстрактов сухих с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях *in vitro* / Е. В. Ферубко, И. А. Лупанова, В. К. Колхир, Т. А. Сокольская // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2014. – № 10. – С. 23–26.
5. Исследование биологической активности винограда культурного листьев красных экстрактов сухих с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях *in vitro* / Е. В. Ферубко, И. А. Лупанова, В. К. Колхир, Т. А. Сокольская // От растения к препарату: традиции и современность. Сборник научных трудов Всероссийской конференции с международным участием посвященной 95-летию со дня рождения профессора Алексея Ивановича Шретера (2014) / общая редакция: Н. И. Сидельников, ответственный редактор: Л. Н. Зайко. – С. 284–288.
6. Изучение биологической активности некоторых природных соединений с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях *in vitro* / И. А. Лупанова, И. В. Воскобойникова, В. К. Колхир, Е. В. Ферубко, Т. А. Сокольская // От растения к препарату: традиции и современность. Сборник научных трудов Всероссийской конференции с международным участием посвященной 95-летию со дня рождения профессора Алексея Ивановича Шретера. (2014) / общая редакция: Н. И. Сидельников, ответственный редактор: Л. Н. Зайко. – С. 237–243.
7. Курманова, Е. Н. К фармакологии серпухи венценосной травы экстракта суммарного (*Serratula coronata* L.) / Е. Н. Курманова, Е. В. Ферубко, И. А. Лупанова // Сборник научных трудов III научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые и фармация XXI века» (2015). – С. 458–460.
8. Исследование биологической активности экстракта из клеточной культуры родиолы розовой (*Rhodiola Rosea* L.) с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях *in vitro* / И. А. Лупанова, Л. Б. Стрелкова, Т. А. Савина,

- Е. В. Ферубко // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2017. – № 3 (17). – С. 9–15.
9. Исследование биологической активности экстракта из биомассы женьшеня обыкновенного (*Panax Ginseng* s.a. Mey) с применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro* / И. А. Лупанова, Н. С. Цыбулько, Т. А. Савина, Е. В. Ферубко // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2017. – № 3 (20). – С. 104–106.
10. Исследование биологической активности сухого экстракта травы володушки золотистой (*Bupleurum Aureum* L.) с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях *in vitro* / И. А. Лупанова, Л. Б. Стрелкова, Е. Н. Курманова, М. А. Джавахян // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2017. – Т. 20, № 5. – С. 3–7.
11. Фармакологическое изучение володушки золотистой травы экстракта сухого / Е. Н. Курманова, Е. В. Ферубко, И. А. Лупанова, Р. К. Курманов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2017. – Т. 27, № 5, приложение № 50. – С. 84.
12. Study of in-vitro biological activity of a multi-component therapeutic product designed for treatment of inflammatory conditions of the oral cavity / I. A. Lupanova, P. G. Mizina, E. V. Ferubko, N. I. Sidelnikov // **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.** – 2017. – Vol. 8, № 4. – P. 933–937.
13. Изучение гепатопротекторной активности экстракта володушки золотистой на модели токсического гепатита / Е. Н. Курманова, Л. Б. Стрелкова, Р. К. Курманов, И. А. Лупанова, М. А. Джавахян, Т. Д. Даргаева, П. Г. Мизина // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2018. – № 2 (20). – С. 62–66.
14. От лекарственного растения к препарату (Володушка золотистая – *Bupleurum Aurei* fisch.) / М. А. Джавахян, О. А. Семкина, Т. Д. Даргаева, В. Н. Дул, В. В. Бортникова, И. А. Лупанова, Л. Б. Стрелкова, Ю. С. Канунникова, Н. И. Сидельников. – М.: РК Салют, 2018. – 186 с.

15. Володушка золотистая – новый объект для разработки растительных лекарственных препаратов / Л. Б. Стрелкова, Е. В. Ферубко, В. П. Панин, И. А. Лупанова, Р. К. Курманов, И. А. Мартынчик, М. И. Панина, М. А. Джавахян, Т. Д. Даргаева, П. Г. Мизина, Н. И. Сидельников // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2018. – Т. 81, № 5. – С. 137.
16. Изучение некоторых фармакологических свойств винограда культурного листьев красных экстракта сухого / И. А. Лупанова, В. К. Колхир, Е. Н. Курманова, В. Н. Дул, Т. Д. Даргаева, Т. Е. Трумпе, М. И. Панина, П. Г. Мизина, Н. И. Сидельников // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2018. – Т. 81, № 5. – С. 256.
17. Патент № 2676085 Российская Федерация. Способ получения растительного средства противовоспалительного и антимикробного действия: опубл. 26.12.2018 / Мизина П. Г., Сидельников Н. И., Гуленков А. С., Крепкова Л. В., Лупанова И. А., Дул В. Н., Фатеева Т. В., Стрелкова Л. Б. – 9 с.
18. Specific activity of biologically active complex in liquid herbal drug extracts, studied under different drying conditions / I. A. Lupanova, P. G. Mizina, N. I. Sidelnikov, A.S. Gulenkov // **Periodico Tche Quimica**. – 2019. – Vol. 16, № 31. – P. 484–490.
19. Исследование активных фракций плодов витекса священного (*Vitex agnus-castus* L.) / Г. В. Адамов, А. И. Радимич, И. А. Лупанова, О. Л. Сайбель // Сборник тезисов докладов V Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии» (2019). – С. 4.
20. Изучение химического состава и дофаминергической активности плодов Витекса священного (*Vitex agnus-castus* L.) / Г. В. Адамов, Е. С. Мельников, И. А. Лупанова, А. И. Радимич, О. Л. Сайбель // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 143–149.
21. Сравнительное изучение биологической активности настоек из лекарственного растительного сырья / И. А. Лупанова, П. Г. Мизина, И. А. Мартынчик, Е. П. Рогожникова // **Биофармацевтический журнал**. – 2020. – Т. 12, № 4. – С. 3–7.

22. Лупанова, И. А. Сравнительное изучение биологической активности сухого экстракта серпухи венценосной *Serratula coronata* L. / И. А. Лупанова, А. И. Радимич // Сборник материалов XXVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тезисы докладов. – М.: Видокс, 2020. – С. 65–66.
23. Лупанова, И. А. Изучение антимикробных свойств объектов растительного происхождения с применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro* / И. А. Лупанова, П. Г. Мизина // Сборник трудов международной научной конференции «От растения до лекарственного препарата», ФГБНУ ВИЛАР, 2020. – С. 400–405.
24. Фенольные соединения и гепатопротекторная активность экстракта травы цикория обыкновенного / О. Л. Сайбель, А. И. Радимич, Т. Д. Даргаева, И. А. Лупанова, Е. В. Ферубко, Е. Н. Курманова, И. А. Мартынчик // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2021. – № 4 (10). – С. 33–42.
25. Экспериментальное исследование фармакологической активности настоек эхинацеи и календулы / И. А. Лупанова, Е. В. Ферубко, Е. Н. Курманова, Е. П. Рогожникова, П. Г. Мизина // Сборник материалов IX Международной научной конференции молодых учёных «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения», Москва, 2021. – С. 464–468.
26. Valuable Hepatoprotective Plants – How Can We Optimize Waste Free Uses of Such Highly Versatile Resources? / L. V. Krepkova, A. N. Babenko, O. L. Saybel', I. A. Lupanova, O. S. Kuzina, K. M. Job, C. M. Sherwin, E. Y. Enioutina // **Frontiers in Pharmacology**. – 2021. – Vol. 12. – P. 1–17.
27. Новые лекарственные средства растительного происхождения ВИЛАР / И. А. Лупанова, Л. В. Крепкова, Е. В. Ферубко, Т. Е. Трумпе, В. В. Бортникова, А. Н. Бабенко, Е. Н. Курманова, Т. В. Фатеева, П. Г. Мизина, Н. И. Сидельников. – М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2021. – 160 с.
28. Оценка антиоксидантной активности экстракта из травы дикорастущего цикория обыкновенного (*Cichorium Intybus* L.) в условиях *in vitro* / И. А. Лупанова, Е. В. Ферубко, Е. Н. Курманова, О. Л. Сайбель, С. М. Николаев //

Сборник материалов III Международного симпозиума «Innovations in life sciences», г. Белгород, 27–28 мая 2021 г. – С. 563–567.

29. Оценка адаптогенной активности серпухи венценосной травы экстракта суммарного (*Serratula Coronata* L.) / Е. В. Ферубко, Е. Н. Курманова, И. А. Лупанова, А. И. Радимич // Сборник конференции «Растительные адаптогены в восстановительной медицине», г. Улан-Удэ, 2021. – С. 42–45.

30. Лупанова, И. А. Изучение биологической активности экстракта травы серпухи венценосной (*Serratula Coronate* L.) в опытах *in vitro* и *in vivo* / И. А. Лупанова, Е. Н. Курманова, А. И. Радимич // Сборник материалов VIII Всероссийской научно-технической конференции, посвященной Году науки и технологий «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации», 26.11.2021. – С. 157–161.

31. Экспериментальное исследование противовоспалительных свойств экстракта травы дикорастущего цикория обыкновенного (*Cichorium Intybus* L.) *in vivo* / И. А. Лупанова, Е. В. Ферубко, Е. Н. Курманова, О. Л. Сайбель, С. М. Николаев // Сборник научных трудов Международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы», Москва, ФГБНУ ВИЛАР, 2021. – С. 563–567.

32. Фармакологический скрининг экстракта травы серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) / И. А. Лупанова, О. Л. Сайбель, Е. В. Ферубко, Е. Н. Курманова, А. И. Радимич, В. К. Колхир, П. Г. Мизина // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2022. – Т. 25, № 3. – С. 3–8.

33. Сравнительное изучение плодов прутняка священного и прутняка китайского / Г. В. Адамов, О. Л. Сайбель, Е. А. Коняева, И. А. Лупанова, А. Н. Цицилин // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2022. – № 10 (25). – С. 3–11.

34. Экспериментальное исследование фармакологической активности настоек пустырника и валерианы / И. А. Лупанова, Е. В. Ферубко, Е. Н. Курманова, П. Г. Мизина // Сборник материалов IV международного симпозиума «Innovations in

life sciences», г. Белгород, 25–27 мая 2022 г. / отв. ред. А. А. Присный. – Белгород: ИД «БелГУ» НИУ «БелГУ», 2022. – С. 67–69.

35. Сравнительное изучение гепатопротекторной активности экстрактов цикория обыкновенного / И. А. Лупанова, Е. Н. Курманова, Е. В. Ферубко, О. Л. Сайбель // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.** – 2022. – № 5 (32). – С. 36.

36. Влияние цикориевой и хлорогеновой кислот из *Cichorium intybus* L. на активность цитохрома P450 и глутатионтрансферазы / И. А. Лупанова, П. Г. Мизина, Н. С. Ионов, В. В. Поройков, А. И. Хлебников, И. А. Мартынчик // **Биофармацевтический журнал.** – 2022. – Т. 5 (14). – С. 8–18.

37. Лупанова, И. А. Гепатопротекторная активность БАВ травы цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) в опытах *in vitro* и *in vivo* / И. А. Лупанова // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2022. – № 7 (25). – С. 20–30.

38. Лупанова, И. А. Методы первичного скрининга биологически активных веществ растительного происхождения (обзор) / И. А. Лупанова // **Биофармацевтический журнал.** – 2022. – Т. 14, № 2. – С. 26–32.

39. Comparative study of chicory herb extract fractions antitoxic effects in rats affected with toxic hepatitis / I. A. Lupanova, O. L. Saibel, E. N. Kurmanova, E. V. Ferubko, P. G. Mizina, N. I. Sidelnikov // **Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии.** – 2022. – № 2 (32). – С. 55–62.

40. Патент № 2771028 Российская Федерация. Способ получения средства, обладающего гепатопротекторным и антигепатотоксическим действием: опубл. 25.04.2022. Бюл. № 12 / Сайбель О. Л., Даргаева Т. Д., Мизина П. Г., Лупанова И.А. [и др.]. –14 с.

41. How Can We Optimize Waste Free Uses of Such Highly Versatile Resources? / L. V. Krepkova, A. N. Babenko, O. L. Saybel, I. A. Lupanova, O. S. Kuzina, K. M. Job, C. M. Sherwin, E. Y. Enioutina – DOI 10.3389/978-2-88976-654-3 // **Dietary Supplements at the Interface of Food and Medicine Valuable Hepatoprotective Plants**

- // Dietary Supplements, Botanicals and Herbs at The Interface of Food and Medicine. – Lausanne: Frontiers Media SA, 2022. – 658 p. – P. 230–246.
42. Изучение фармакологической активности экстрактов из суспензионных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой / И. А. Лупанова, П. Г. Мизина, Е. В. Ферубко, С. Б. Мясникова // **Патологическая физиология и экспериментальная медицина**. – 2023. – № 2 (67). – С. 77–85.
43. Лупанова, И. А. Методы первичного скрининга биологически активных веществ растительного происхождения / И. А. Лупанова, П. Г. Мизина // Сборник материалов V Международного симпозиума «Innovation in life science», Белгород, 2023. – С. 342.
44. Лупанова И. А. Специфические ферментные биотест-системы для оценки биологической активности лекарственных растительных средств / И. А. Лупанова // Материалы IX Международной научно-методической конференции «Фармообразование – 2023», 28–29 сентября 2023 г. – С. 595–599.
45. Лупанова, И. А. Сравнительное изучение фармакологической активности экстрактов цикория обыкновенного / И. А. Лупанова, П. Г. Мизина // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2023. – Т. 57, № 8. – С. 51–58.
46. Лупанова, И. А. Совершенствование методологии лабораторного контроля качества растительных лекарственных средств с применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro* / И. А. Лупанова // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2023. – № 12 (26) – С. 15–24.
47. Оценка фармакологической активности флавоноидной фракции травы серпухи венценосной / И. А. Лупанова, Е. В. Ферубко, Д. В. Шишканов, Е. Н. Курманова, А. И. Радимич // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2024. – № 6 (27). – С. 3–10.
48. Патент № 2802434 Российская Федерация. Смесь экстрактов плодов *Ziziphus jujube* Mill., обладающая противоязвенным, противовоспалительным действиями: опубл. 28.08.2023 / Семкина О.А., Асатуров Ю.В., Джавахян М.А., Лупанова И. А., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н., Мизина П.Г. – 11 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДФ – адендифосфат
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АСТ – аспартатаминотрансфераза
АТФ – аденозинтрифосфат
БАС – биологически активные соединения
ГЛС – готовое лекарственное средство
ГР – глутатионтредуктаза
ГТФ – глутатионтрансфераза
КАТ – каталаза
ЛП – лекарственный препарат
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма)
НД – нормативная документация
ПК – пируваткиназа
РЛС – растительное лекарственное средство
СФБТС – специфические ферментные биотест-системы
СЭВЗ – сухой экстракт травы володушки золотистой
СЭТС – сухой экстракт травы серпухи венценосной
ТГ – тирозингидроксилаза
ЦитР450 – цитохром Р450
ЩФ – щелочная фосфотаза
ЭЛФ – экспериментальная лекарственная форма
in silico – компьютерное моделирование (симуляция) эксперимента
in vitro – эксперименты «в пробирке», вне живого организма
in vivo – проведение экспериментов «внутри живого организма»
iNOS – индуцибельная NO синтаза
АНР – Американская травяная фармакопея
P_a – вероятность принадлежности соединения к классу «активные»
P_i – вероятность принадлежности соединения к классу «неактивные»