

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

*На правах рукописи*

**Лупанова Ирина Александровна**

**Методология формирования и применения  
специфических ферментных биотест-систем  
для оценки биологически активных соединений**

1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Научный консультант:  
**Мизина Прасковья Георгиевна,**  
доктор фармацевтических наук, профессор

Москва – 2025

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>Глава 1. ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ РАЗЛИЧНЫХ<br/>БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ (обзор литературы) .....</b>   | <b>14</b> |
| 1.1. Виртуальные методы <i>in silico</i> .....  | 17        |
| 1.2. Биотест-системы молекулярного уровня .....   | 25        |
| 1.3. Биотест-системы клеточного уровня.....   | 28        |
| 1.4. Биотест-системы тканевого уровня .....   | 31        |
| 1.5. Биотест-системы организменного уровня.....   | 31        |
| Выводы по обзору литературы .....   | 37        |
| <b>Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....</b>   | <b>39</b> |
| 2.1. Объекты исследования .....   | 39        |
| 2.2. Методы исследования .....  | 41        |
| 2.2.1. Методы <i>in silico</i> .....  | 41        |
| 2.2.2. Методы <i>in vitro</i> .....   | 43        |
| 2.2.3. Методы <i>ex vivo / in vivo</i> .....  | 47        |
| 2.2.4. Математические методы .....  | 52        |
| Выводы по главе 2.....  | 53        |
| <b>Глава 3. ФЕРМЕНТЫ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ<br/>МОЛЕКУЛЯРНОГО УРОВНЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НА ИХ ОСНОВЕ<br/>СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ (СФБТС).....</b> | <b>54</b> |
| 3.1 Ферменты, используемые в качестве тест-объектов .....   | 55        |
| 3.1.1 НАДФН-оксидаза .....  | 55        |
| 3.1.2 Каталаза .....  | 60        |
| 3.1.3 Глутатионредуктаза.....   | 62        |
| 3.1.4 Пируваткиназа.....  | 66        |
| 3.1.5 Тирозингидроксилаза.....  | 69        |
| 3.1.6 Цитохром P <sub>450</sub> .....   | 72        |
| 3.1.7 Глутатионтрансфераза .....  | 75        |
| 3.1.8 Индуцибельная NO-синтаза.....   | 77        |
| 3.2 Биологическая коллекция специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> .....   | 79        |
| 3.4 Создание методологии формирования и применения специфических ферментных биотест-систем.....   | 83        |
| Выводы по главе 3 .....   | 85        |
| <b>Глава 4. ИСПЫТАНИЕ ВТОРИЧНОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ<br/>ФЕРМЕНТНОЙ.....</b>   | <b>88</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>БИОТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ АДАПТОГЕННЫХ СВОЙСТВ НА ПРИМЕРЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ.....</b>               | <b>88</b>  |
| 4.1 Изучение безопасности биологически активных соединений .....   | 88         |
| 4.2 Вторичная СФБТС для оценки биологически активных соединений из биотехнологического сырья.....                          | 88         |
| Выводы по главе 4 .....  | 100        |
| <b>Глава 5. ИСПЫТАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ .....</b>              | <b>101</b> |
| 5.1. Испытания вторичной СФБТС для оценки эффективности настоек из растительного лекарственного сырья в эксперименте ..... | 101        |
| 5.2. Испытания вторичной СФБТС для оценки эффективности таблеток с жидким растительным экстрактом в эксперименте .....     | 105        |
| 5.3. Испытания вторичной СФБТС для оценки эффективности спрея и таблеток с растительными экстрактами в эксперименте .....  | 111        |
| Выводы по главе 5 .....  | 117        |
| <b>Глава 6. ИСПЫТАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОЦЕНКИ БАС ИЗ НАТИВНОГО СЫРЬЯ .....</b>                  | <b>119</b> |
| 6.1. Испытание вторичной СФБТС для оценки венотропных свойств биологически активных соединений .....                       | 119        |
| 6.2 Испытания вторичной СФБТС для оценки адаптогенных свойств биологически активных соединений .....                       | 127        |
| 6.3 Испытания первичной СФБТС для оценки дофаминергических свойств биологически активных соединений .....                  | 132        |
| 6.4 Испытания вторичной СФБТС для оценки гепатопротективных свойств биологически активных соединений .....                 | 137        |
| Выводы по главе 6 .....  | 142        |
| <b>Глава 7. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ .....</b>                                   | <b>144</b> |
| 7.1 Скрининг биологической активности соединений .....   | 146        |
| 7.1.1 Испытания СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы, а также индуцибельной NO-синтазы .....                      | 146        |
| 7.1.2 Испытания вторичной СФБТС на основе цитохрома P <sub>450</sub> и глутатионтрансферазы.....                           | 151        |
| 7.1.3 Испытания первичной СФБТС на основе НАДФН-оксидазы ...   | 157        |
| 7.2 Применение специфических ферментных биотест-систем для выявления целевых биологически активные соединений .....        | 160        |
| 7.3 Изучение возможности связывания биологически активных соединений с активными центрами ферментов .....                  | 166        |
| Выводы к главе 7 .....   | 177        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>Глава 8. ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ .....</b>  | <b>179</b> |
| 8.1 Расчет стоимости исследования адаптогенной активности субстанций из травы серпухи венценосной.....   | 179        |
| 8.2 Расчет стоимости исследования венотропной активности субстанций из красных листьев винограда культурного .....   | 185        |
| Выводы по главе 8 .....  | 191        |
| <b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>  | <b>193</b> |
| ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....  | 195        |
| РЕКОМЕНДАЦИИ.....  | 196        |
| <b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....</b>   | <b>197</b> |
| <b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>   | <b>199</b> |
| <b>Приложение А. Положение о Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> .....</b>   | <b>240</b> |
| <b>Приложение Б. Реестр Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> .....</b>  | <b>247</b> |
| <b>Приложение В. Метод расширения Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> .....</b>  | <b>252</b> |
| <b>Приложение Г. Метод характеристики единиц хранения Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> .....</b>  | <b>253</b> |
| <b>Приложение Д. СОП «Коррекция нарушений качества единиц хранения Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>».....</b>   | <b>254</b> |
| <b>Приложение Е. СОП «Поддержание единиц хранения Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>» .....</b>   | <b>255</b> |
| <b>Приложение Ж. СОП «Контроль качества единиц хранения Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i>» .....</b>   | <b>256</b> |
| <b>Приложение И. СОП «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы <i>in vitro</i>» .....</b> | <b>257</b> |
| <b>Приложение К. СОП «Определение иммуномодулирующих свойств растительных биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе НАДФН-оксидазы <i>in vitro</i>».....</b>  | <b>258</b> |
| <b>Приложение Л. СОП «Определение антитоксических свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной</b>   |            |



|   |     |
|---|-----|
| специфической ферментной биотест-системы на основе цитохрома P450 и глутатионтрансферазы <i>in vitro</i> » .....  | 259 |
| Приложение М. «Определение скорости тирозингидроксилазной реакции методом прямого спектрофотометрического измерения» .....  | 260 |
| Приложение Н. СОП «Определение противовоспалительных свойств растительных биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе индуцибельной NO-синтазы (iNOS) <i>in vitro</i> »..... | 261 |
| Приложение П. СОП «Определение вено-tonизирующих свойств биологически активных веществ с применением комплекса специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> » .....  | 262 |
| Приложение Р. Методические рекомендации по применению специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> при исследовании биологической активности растительных объектов .....   | 263 |
| Приложение С. Патент на изобретение № 2676085 от 26.12.2018 .....   | 264 |
| Приложение У. Патент на изобретение № 2802434 от 28.08.2023 .....   | 266 |

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования** 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

| <i>№<br/>п/п</i> | <i>Уровень биотест-систем</i> | <i>Примеры</i>  |
|------------------|-------------------------------|---|
| 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.               | <b>Молекулярный</b>           | ДНК, белки, <b>ферменты</b> , 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 специфиче-

ских 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: исследование, 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.

## **Глава 1. ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ РАЗЛИЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ (обзор литературы)**

Разработка нового лекарственного препарата, кроме химических, физических, технологических стадий, включает обязательные доклинические (фармакологические и токсикологические) исследования. Одним из важнейших этапов таких исследований, без которых невозможно дальнейшее продвижение новых фармацевтических разработок [97], является скрининг БАС [86].

Изучение биологической активности целесообразно применять при оценке БАС, сложных по составу, или в процессе получения которых может происходить структурное, конфигурационное изменение молекул, что приводит к изменению или потере целевой биологической активности [103].

На сегодняшний день существует большое количество тест-систем [308] для оценки БАС, которые можно разделить по их уровню организации (Таблица 1).

**«Биотест-система (БТС) – это интегрированное сочетание биодатчика (биообъекта) молекулярного, клеточного, тканевого и организменного уровней со считывающим, обрабатывающим и регистрирующим устройством. В качестве биообъекта наибольшее распространение на данный момент получили биомакромолекулы – ферменты, антитела, рецепторные белки, нуклеиновые кислоты, а также целые клетки» [11].**

Каждая из тест-систем имеет свои особенности и характеризуется своими техническими способами реализации. Наибольшую популярность получили экспресс-методы, основанные на регистрации общебиологических характеристик, таких как подсчет численности или прироста популяций [16].

Классический подход к изучению субстанций заключается в первоначальном выявлении целевых соединений, определении их биологической активности с последующим изучением фармакокинетики [312].

Несмотря на то, что такой подход доказал свою эффективность, он требует больших затрат времени, труда и финансов. В таких исследованиях задействовано

большое количество биологических тест-систем организменного уровня, в том числе лабораторных животных, что противоречит концепции «трех R»:

1) «*Replacement*: выбор и замена» – замена в опыте, когда это возможно, высокоорганизованных животных менее развитыми живыми объектами, альтернативными методами;

2) «*Reduction*: адекватность и стандартизация» — это достижение воспроизводимых результатов с использованием минимального количества животных; адекватный выбор лабораторных животных; использование стандартных по микробиологическим, генетическим и экологическим параметрам животных; оптимальное планирование и, что крайне важно, использование статистических методов не только при обработке полученных данных, но и на стадии планирования;

3) «*Refinement*: уменьшение дистресса, боли и страданий» — это улучшение условий содержания лабораторных животных и использования их в экспериментах, уменьшение дистресса животных во время экспериментов и применение обезболивающих средств, но не в ущерб цели эксперимента [85].

При изучении биологической активности ряда БАС выявляется их несовместимость с высокопроизводительным скринингом [209], который в последние десятилетия применяется в качестве стандартного подхода для поиска новых лекарств в фармацевтической промышленности и ветеринарии и основывается на использовании компьютерных и роботизированных технологий. Высокопроизводительный скрининг – это процесс изучения активности большого количества химических соединений по отношению к конкретным биологическим мишеням. Основное преимущество этого метода – ускорение процесса поиска лекарственных средств за счет скрининга больших библиотек со скоростью, которая может превышать несколько тысяч соединений в день [152]. Исследование большого количества объектов сложного состава (например, субстанций из растительного лекарственного сырья) с помощью высокопроизводительного скрининга с последующей идентификацией и характеристикой биологически активных компонентов представляет собой сложную задачу. При высокопроизводительном скрининге для определения

биологической активности растительных экстрактов и для идентификации их сильнейших индивидуальных веществ необходимы адаптация и изменение подготовки образцов и планов анализа. Как правило, его можно проводить с использованием молекулярных или клеточных тест-систем. Исследуемые соединения не должны разлагаться или осаждаться, взаимодействовать с реагентами для анализа и проявлять неспецифические эффекты.

Из-за сложного состава с растительного происхождения могут быть нестабильны, гигроскопичны, либо обладать высокой вязкостью, они склонны к агрегации или осаждению, могут содержать компоненты, которые неспецифически связываются с белками, что может привести к ошибочным результатам анализа [209; 244]. Все эти особенности требуют сложной подготовки образцов, например, фракционирования неочищенных экстрактов перед тестированием [134; 200; 231; 286; 307]. Растительные объекты могут содержать флуоресцирующие или гасящие флуоресценцию соединения, которые влияют на результаты флуоресцентного скрининга, а присутствие окрашенных соединений может исказить результаты колориметрических исследований [174; 181; 343]. Они могут содержать классы соединений, которые препятствуют проведению определенных типов анализов и могут приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. Особые проблемы могут создавать резко неполярные соединения, например, жирные кислоты [116], распространенные полярные соединения, такие как полифенолы и флавоноиды [340; 343], а также хлорофилл [181], поскольку они могут создавать помехи при некоторых видах анализах. Необходимо приложить много усилий, чтобы удалить такие компоненты из образцов перед тестированием [136; 261] или поменять аналитическую систему, чтобы избежать их обнаружения [283]. Наряду с органическими молекулами некоторые неорганические компоненты, в частности металлы, могут приводить к ложноположительным результатам при скрининге [182]. Это может быть особенно проблематично для высокопроизводительного скрининга растительных экстрактов, так как многие растения концентрируют металлы из окружающей среды [156], кроме того, примеси металлов могут

присутствовать и в коммерчески доступных образцах растений [150]. Цитотоксические компоненты могут затруднять измерения, проводимые на клетках, так как они могут маскировать выявление других видов биологической активности или присутствие других соединений с желаемой эффективностью. Например, сапонины, обладающие поверхностно-активными свойствами, могут вызывать лизис клеток и, следовательно, влиять на результат таких тестов [181].

В связи с этим рассмотрим способы оценки биологической активности соединений согласно классификацию по типу биологической мишени, которую предложили Хохлов А. Л. и соавт. [80]:

– виртуальный – *in silico*, среди соединений из различных химических библиотек, таких как собственные базы данных фармацевтических компаний, специально сконструированные библиотеки молекул, библиотеки уже синтезированных коммерчески доступных соединений и др.;

– молекулярный – *in vitro*, на очищенных рекомбинантных белках изучается влияние исследуемых веществ на белковые взаимодействия, активность белков;

– клеточный – *in vitro*, на клеточной модели заболевания;

– на животных – *in vivo*, экспериментальные модели патологии на лабораторных животных.

### 1.1. Виртуальные методы *in silico*

В основе виртуальных методов (*in silico*) оценки биологической активности лежит компьютерный алгоритм, на вход которого можно подать структуру химического соединения и получить на выходе ответ на вопрос, активно ли соединение по отношению к заданной терапевтической мишени [277]. Модели *in silico* могут применяться для оценки биологической активности БАС, в том числе растительного происхождения [328], на этапе фармацевтической разработки. Однако ограничением для подобных исследований является необходимость наличия информации о структуре и стереохимии объектов исследования [277].

Моделирование *in silico* используют для предположений о связывающих свойствах белковых лигандов для молекулярных структур, например, известных

компонентов растительных экстрактов. Соединения, которые хорошо работают в моделях *in silico*, могут быть использованы в качестве перспективных исходных материалов для экспериментальной работы [251]. Молекулярные дескрипторы соединения можно рассчитать на основе его двумерной или трехмерной структуры. Простыми примерами таких дескрипторов является число способных к вращению связей или акцепторов водородных связей. Эти дескрипторы можно сравнить с наборами данных об активных соединениях, чтобы распознать корреляции и составить модели количественного соотношения структуры и активности (QSAR) для предварительного отбора соединений с более высокой вероятностью активности в отношении конкретной мишени [114]. Например, в исследовании Gavernet и соавт. использовали модели QSAR для скрининга новых потенциальных противосудорожных средств в базе данных природных соединений, содержащей 10900 молекул. Применяя серию вычислительных фильтров, они предложили четыре подходящих соединения, одно из которых было экспериментально оценено и подтверждено как активное [167].

При применении такого метода к растительным компонентам важно учесть, что они часто отличаются от типичных синтетических биологически активных молекул (например, размером, количеством ароматических колец, гибкостью), которые в основном можно найти в базах данных, таких как ChEMBL [166] или PubChem [219], а Feher и соавт. показали необходимость в тщательной оценке наборов данных на совместимость [155].

Подход с использованием методов *in silico* не является универсальным, так как ресурсы существующих в настоящее время суперкомпьютеров не позволяют рассчитывать взаимодействия биомолекул *de novo* и используют различные приближения [338]. Кроме того, многим проанализированным соединениям присваивается статус потенциально активных, но полученные данные не всегда подтверждаются в экспериментах *in vivo* [183]. При этом методы *in silico* широко применяются для выявления новой биологической активности БАС, в том числе раститель-

ного происхождения [1], предположения ADME/T (всасывание, распределение, метаболизм и выведение), а также выявления новых свойств уже зарегистрированных лекарственных препаратов (перепрофилирование лекарств) [296].

Для растительных объектов, чей механизм действия чаще всего не известен, многие исследователи предпочитают на первом этапе проводить оценку биологической активности РЛС с помощью компьютерных технологий с целью идентифицировать «подходящую» мишень для дальнейших исследований используя соответствующие определенным заболеваниям наборы тестов [103]. Виртуальный подход, основанный на знаниях, помогает выбрать объект, с высокой вероятностью обладающий биологической активностью [113]. Соединения, которые хорошо работают в моделях *in silico*, могут быть использованы в качестве перспективных исходных материалов для экспериментальной работы, успешное прогнозирование активности с использованием виртуального скрининга представлены, например, в работе [180], которое может быть выполнено с применением широкого спектра различных вычислительных методов [277].

Экспериментальное тестирование взаимодействия многих миллионов химических соединений с тысячами молекулярных мишеней невозможно как с экономической, так и с практической точки зрения [222]. Таким образом, возникает необходимость предварительного отбора молекул, с наибольшей вероятностью взаимодействующих с целевыми молекулярными мишенями и проявляющих, благодаря такому взаимодействию, необходимое фармакотерапевтическое действие. С этой целью сегодня широко применяют компьютерные методы дизайна лекарств, основанные как на структуре макромолекулы-мишени, так и на структуре лигандов [25; 145].

### **Программа PASS**

В настоящее время существует около 20 свободно доступных в сети интернет веб-сервисов, которые предсказывают свыше 4000 видов биологической активности, острую токсичность для крыс при четырех способах введения вещества в организм, взаимодействие с нежелательными мишенями, влияние на опухолевые и неопухолевые клеточные линии и др. [140]. Достаточно быстрым и эффективным методом оценки биологической активности веществ является использование баз

данных, на основе которых возможен предварительный прогноз структурных аналогов с целевыми биологическими свойствами. Так работает программа компьютерного прогнозирования спектра биологической активности PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) [185; 78].

Спектр биологической активности, полученный с помощью PASS, включает в себя фармакологические эффекты, молекулярные механизмы действия, специфическую токсичность и побочные эффекты, метаболизм и др. [78].

«Результат прогноза биологической активности представляется в PASS в виде вероятностей  $P_a$  «быть активным» («to be active») и  $P_i$  «быть неактивным» («to be inactive»)» [265]. В итоге пользователь получает прогноз спектра биологической активности в виде упорядоченного списка по убыванию разности оценок вероятности  $P_a - P_i$ : более вероятные виды активности находятся в верхней части списка [202].

Поройков В. В. и соавт. показали, что при интерпретации результатов прогноза необходимо учитывать «новизну анализируемого соединения по сравнению с соединениями в обучающей выборке, а результатам прогноза  $0,3 < P_a < 0,7$  соответствуют наиболее вероятные структуры активных соединений. Если же  $P_a > 0,7$ , то шансы обнаружить активность в эксперименте довольно высоки, и соединение, скорее всего, сочетает в себе наиболее важные особенности активных соединений» [78]. Adnan M. и соавт. предложили в качестве общей рекомендации последовательно изучать биологическую активность от наиболее вероятного ее вида к менее вероятному [102].

На сегодняшний день разработаны программы компьютерной визуализации, которые с помощью вычислительных методов определяют, возможно ли взаимодействие молекулы-мишени с анализируемым соединением, и, если да, то по каким группам оно будет происходить [100].

Одной из программ, широко применяемых для вычислительных экспериментов виртуального межмолекулярного взаимодействия, является программа Pass [99]. Спектры биологической активности БАС в исследуемых объектах были рассчитаны с применением современной версии компьютерной программы PASS



[158]. Программа PASS позволяет оценивать вероятности наличия и отсутствия 1957 видов биологической активности со средней точностью около 97 %. Алгоритм PASS основан на наивном байесовском классификаторе [158] и представлении структуры химических соединений в виде MNA-дескрипторов (Multilevel Neighborhoods of Atoms) [157]. Входными данными для PASS служат структуры, представленные в формате MOL или SDF [157]. Результатом компьютерного прогноза является список вероятных активностей для каждого соединения с соответствующими оценками вероятности:  $P_a$  – вероятность принадлежности соединения к классу «активные»,  $P_i$  – вероятность принадлежности соединения к классу «неактивные». Все активности, для которых расчетные значения  $P_a$  превышают  $P_i$ , рассматриваются как вероятные.

Для проведения прогноза биологической активности структуры молекул должны отвечать следующим требованиям:

- молекулярная масса молекулы должна быть в диапазоне от 50 до 1250 атомных единиц массы;
- молекула должна быть электронейтральной;
- в состав молекулы должно входить не менее трех атомов углерода [78].

Анализ аддитивного/синергетического действия и возможных межлекарственных взаимодействий исследуемых химических соединений был проведен с применением компьютерной программы PharmaExpert. В основе PharmaExpert лежит база знаний, содержащая информацию о более чем 15 тысячах известных взаимосвязей между фармакологическими эффектами и механизмами действия фармакологических веществ [142].

Целесообразность применения PASS и PharmaExpert для анализа биологической активности фитокомпонентов лекарственных растений была продемонстрирована в многочисленных исследованиях [172; 257; 168; 201; 212; 315; 192].

PASS не позволяет оценить влияние стереоизомерии на проявление биологической активности, но это позволяет, например, молекулярный докинг. Возможности Программы ограничены перечнем прогнозируемых видов активности, который

составлен с учетом современного состояния фармакологической науки, и источниками данных о результатах экспериментального исследования органических соединений на биологическую активность [118; 187; 264].

Применение методов оценки *in silico* дает возможность определить перспективные направления исследований и, как следствие, снизить временные и финансовые издержки на разработку препаратов, особенно включающих комплексы природных соединений [27]. Однако все данные, полученные *in silico*, должны обязательно подтверждаться на следующих этапах доклинических исследований [253].

#### *Молекулярный докинг*

Метод молекулярного докинга позволяет виртуально выявлять возможные механизмы действия БАС, предсказывая пространственную структуру комплекса рецептор-лиганд и свободную энергию его образования, исходя из данных о пространственной структуре рецептора, известной с разрешением в несколько ангстрем (например, полученной с помощью рентгено-структурного анализа) и химической структуре лиганда [117; 133; 199].

Впервые молекулярный докинг был разработан для исследования молекулярного взаимодействия между большими и малыми молекулами, но в настоящее время его используют для «предсказания пространственной структуры комплекса рецептор-лиганд и свободной энергии его образования, исходя из данных о пространственной структуре рецептора, известной с разрешением в несколько ангстрем (например, полученной с помощью рентгеноструктурного анализа), и химической структуре лиганда [269], для обратного и высокопроизводительного скрининга, многоцелевого дизайна и изменения положения лиганда» [141; 175].

В настоящее время компьютерное моделирование является неотделимой частью фундаментальных исследований молекулярных механизмов деятельности белков, а также при разработке дизайна новых лекарственных соединений [207; 269]. Моделирование *in silico* также может быть использовано для предположений о связывающих свойствах белковых лигандов для молекулярных структур, например, известных компонентов растительных экстрактов [114; 274].

Одним из таких методов и является молекулярный докинг, который используется для поиска наиболее достоверной ориентации и конформации лиганда в центре связывания белка-мишени. Благодаря полученной с помощью данного метода информации, ученые могут ускорить или, наоборот, избежать биохимических реакций, катализатором которых является молекула мишени [303]. Для поиска используют большие библиотеки трехмерных структур малых молекул. Pinzi L. и Rastelli G. (2019) показали, что в основе работы компьютерной программы докинга лежит процесс молекулярного распознавания – оценка взаимодействия между молекулами за счет нековалентных связей (силы электростатического отталкивания – притяжения, водородных связей, силы Ван-дер-Ваальса, гидрофобных сил, галагенового связывания и  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия) [262].

Saikia S. и Bordoloi M. (2019) в своей работе использовали метод «гибкого» докинга для низкомолекулярных соединений, допуская конформационную подвижность лиганда при жесткой неподвижной структуре белка. Авторы установили, что в случае оценки геометрического соответствия молекулярная поверхность активного центра белка описывается с позиции ее доступности для контакта, а молекулярная поверхность лиганда – с позиции комплиментарности поверхности белка. Комплиментарность поверхностей является мерой эффективности связывания пары мишень – лиганд. Однако недостатком таких методов является то, что большинство из них не учитывают конформационную подвижность белка и лиганда. В то же время благодаря высокой скорости вычисления методы на основе комплиментарности поверхностей подходят для быстрого виртуального скрининга больших молекулярных библиотек, а также для расчета связывания высокомолекулярных соединений [281].

Методы анализа энергии взаимодействия лиганда с белком основаны на оценке энергии системы при всех возможных пространственных конформациях лиганда для поиска наиболее энергетически выгодного состояния. Такие методы более точно моделируют взаимодействие, но требуют больших вычислительных ресурсов [303].

Forli S. и соавт. (2019) описали, что результатом докинга является ранговый список положений, которые необходимо грамотно интерпретировать для понимания молекулярных механизмов, а также для дальнейшего использования полученных данных при разработке лекарственных средств [160], что позволит оценить десятки тысяч потенциальных биологически активных соединений [170].

Программное обеспечение для данного метода было разработано в течение последнего десятилетия, например, DOCK, AutoDock [160], Vina GOLD, FlexX и др. Эти типы программного обеспечения решают разнообразные задачи и обладают разной точностью [148; 199; 290].

Плюсами данного метода являются: выявление ключевых аминокислотных остатков в активном центре белка, «позволяющее изучать структурно-динамические основы ферментативных реакций на атомном уровне и рациональный дизайн лигандов и/или рецепторов с заранее заданными селективностью, кинетическими свойствами» и т.д. [269].

Из-за сложного состава растительных экстрактов их трудно идентифицировать традиционными методами. Однако благодаря применению молекулярного докинга это возможно [138]. Так, например, Gao B. (2014) и соавт. определяли взаимодействие нотогинсенозида из корней *Panax notoginseng* (Burk.) F.H. Chen Ft1 с рецептором p2y<sub>12</sub> тромбоцитов и далее экспериментально подтвердили полученные данные в опытах *in vitro* [165]. Авторы проводили скрининг сапонинов, обладающих гемостатической активностью, *in silico* и установили основной механизм влияния Ft1 на гематологические нарушения. В этом контексте молекулярное взаимодействие позволяет выявлять отдельные вещества в многокомпонентных объектах.

Chen L. и соавт. (2014) с помощью молекулярного докинга оценивали противоопухолевую активность растительных БАС, используемых в китайской медицине, которые участвуют в регуляции иммунитета [130]. Авторы смогли выявить лучших кандидатов, для дальнейших исследований *in vitro* и с помощью фармакологических моделей на лабораторных животных.

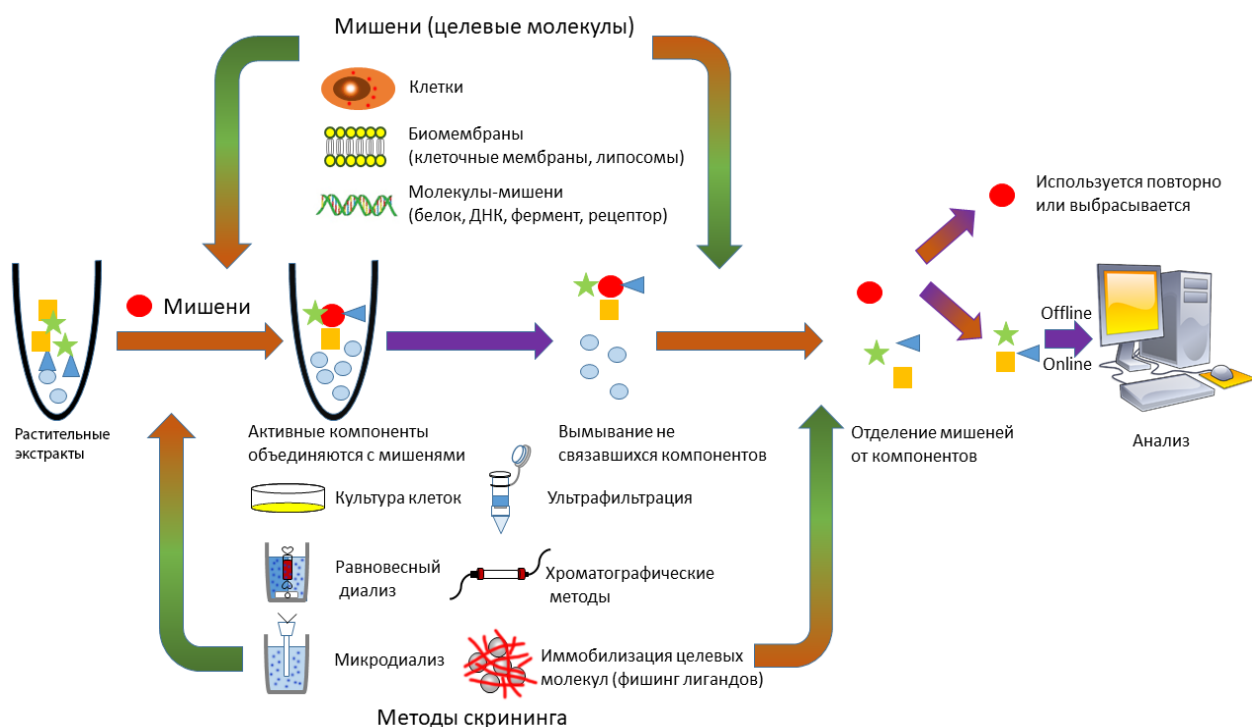
Основываясь на результатах вышеупомянутых исследований, можно сделать вывод, что применение метода молекулярного докинга позволяет значительно

улучшить эффективность процесса контроля качества РЛС, позволяя предположить молекулярные механизмы их действия, давая более точную оценку их эффективности и безопасности. Тем не менее, применение докинга ограничено наличием информации о структуре биологической мишени. Для решения этой проблемы можно использовать молекулярную динамику для подтверждения полученных результатов [330; 179]. Таким образом, метод молекулярного докинга может предложить огромный потенциал при разработке лекарственных растительных средств [199].

## **1.2. Биотест-системы молекулярного уровня**

Современные фармакологические исследования показали, что действие лекарственного средства определяется его способностью взаимодействовать с цитозольными и/или трансмембранными белками [218; 235]. Экстракты ЛРС содержат множество компонентов, и процесс выделения под контролем биологического анализа и скрининга может быть использован для ускорения идентификации целевых БАС [126; 176].

Разработаны биотест-системы для изучения активности для нескольких биологических мишеней, включая ДНК, белки, ферменты и рецепторы (Рисунок 1). Когда биологические мишени инкубируют с растительными экстрактами, потенциальные биологически активные соединения избирательно связываются с молекулами-мишенями, а не связавшиеся соединения вымываются. Активные соединения, выделенные из мишеней, анализируют хроматографическими методами, сочетаемыми с масс-спектрометрией или другими детекторами. Это не только позволяет идентифицировать потенциальные БАС, но также дает важную информацию о механизме их действия на молекулярном уровне [164].



**Рисунок 1** – Схема анализа БАС растительного происхождения в средствах традиционной китайской медицины (цит. по [164])

Rask-Andersen M. и соавт. (2011) показали в своей работе классический метод оценки биологической активности *in vitro* на основе тест-объектов молекулярного уровня – белков, основанный на изучении функциональной активности целевого белка в присутствии тестируемого соединения или физического взаимодействия тестируемого соединения с целевым белком. Подобное исследование обычно может быть выполнено в любой универсальной лаборатории без необходимости использования клеточных культур или лабораторных животных. Авторы установили, что среди лекарственных препаратов, одобренных FDA (Food and Drug Administration) в течение последних трех десятилетий самой большой группой белков-мишеней являются рецепторы (193 белка-мишени, 563 одобренных препарата), за которыми следуют ферменты (124 белка-мишени, 234 препарата), белки-транспортёры (67 белков-мишеней, 181 препарат) и другие типы белков (51 белок-мишень, 84 препарата). Наиболее распространены среди них модели на основе G-белок-связанных рецепторов, гидролаз и потенциал-зависимых ионных каналов [272]. Установленное в ходе исследования изменения активности белка часто отражает связывание его активного центра с тестируемым соединением, которое тем самым блокирует его. Данные методы позволяют выявлять «механизм активности», при этом

установленная с их применением биологическая активность иногда не воспроизводится на более сложных биологических моделях, таких как клетки и многоклеточные организмы [114].

### **Специфические ферментные биотест-системы (СФБТС)**

Впервые СФБТС были предложены в 1997 году Минеевой М. Ф. и Быковым В. А. Использование ферментных биотест-систем не требует больших временных затрат, они высокочувствительны, специфичны и поэтому все чаще применяются при исследовании лекарственных средств, в том числе растительного происхождения [9].

Дубинская В. А. и соавт. (2016) предположили, что ферменты, которые связаны с различными физиологическими и патологическими процессами *in vivo*, можно рассматривать как одну из основных мишеней для лекарственных средств. Ферменты, применяемые в качестве тест-объектов, быстро реагируют на изменение (в том числе и под действием лекарственного вещества) внутренней среды организма, ускоряя или замедляя скорость биохимических реакций [19]. Так Akter R. и соавт. (2021) установили, что наличие одинаковых доменов (аминокислотных последовательностей) в молекулах рецепторов и соответствующих им лимитирующих ферментов позволяет использовать лимитирующие ферменты в качестве тест-объектов для поиска БАС, мишенями которых служат соответствующие рецепторы. При этом использование кинетических параметров ферментативных реакций для оценки механизма действия изучаемых веществ позволяет получить более полную информацию, чем использование рецепторов в качестве тест-объектов [105].

Наиболее интересными с точки зрения исследователей, являются тест-ферменты: холинэстераза [104], ксантиноксидаза [314], тирозиназа [188], амилаза [292; 216], глюкозидаза [335], ацетилхолинэстераза [301] и многие другие [247].

Atanasov A. и соавт. (2021) описали, что наблюдаемое при тестировании *in vitro* ингибирование ферментов часто отражает связывание испытываемого соединения с активным центром белка-мишени, что приводит к его блокированию.

В других случаях тест-система может быть разработана для отражения ингибирования межбелкового взаимодействия, необходимого для функциональной активности, или активации белка, вызванной связыванием соединения. Однако авторы отмечают, что эти тесты не могут гарантировать функциональность фермента в более сложных биологических системах (клетках и в условиях целого организма). В результате многие потенциальные соединения не подтверждают выявленную биологическую активность при дальнейших исследованиях *in vitro* (например, с использованием культур клеток) или в экспериментах *in vivo* [114]. Несмотря на это, скрининг с использованием конкретных очищенных белков широко и весьма успешно применяется во многих фармацевтических компаниях при разработке лекарственных препаратов, например, при идентификации селективных ингибиторов различных киназ [135; 255].

### 1.3. Биотест-системы клеточного уровня

Методы оценки биологической активности на основе клеток-мишеней (клеточный уровень) играют все более важную роль в скрининге активных компонентов сложных БАС. Использование целых живых клеток означает, что все рецепторы, каналы, ферменты и другие клеточные компоненты доступны для скрининга тестируемых соединений [225]. Многочисленные клеточные методы скрининга уже успешно применялись для идентификации, например, растительных биологически активных соединений [164].

Zhang G.-J. и соавт. (2007) показали, что исследование биоактивных компонентов с помощью клеток-мишеней можно проводить с использованием либо классической системы культивирования клеток, либо в системе полых волокон [333]. Классическая система фишинга на основе клеточных культур использовалась для скрининга растительных БАС в работах Hong M. и соавт. (2011) и Sun M. и соавт. (2015): клетки, культивируемые в культуральном флаконе или на планшете, инкубировали с растительными экстрактами и денатурировали их добавлением раствора солянокислого фосфатного буфера (PBS) (pH 4,0) для высвобождения связанных компонентов для последующего анализа [186; 298].



Yuan J. B. и соавт. (2016) разработали метод скрининга на основе клеток SH-SY5Y для выделения из корней женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng* C.A. Mey) биоактивных соединений-кандидатов против нейродегенеративных заболеваний. Культивируемые клетки SH-SY5Y ресуспендировали в среде и инкубировали, чтобы обеспечить взаимодействие между ними и экстрактом женьшеня. Анализ проводили с применением ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с квадрупольно-времяпролетной масс-спектрометрией (UPLC-Q-TOF-MS). В этом исследовании были идентифицированы 4 потенциальных активных компонента женьшеня [331]. Liu S. Q. и соавт. (2016) использовали аналогичный подход, сочетая HepG2 (клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека) с высокоэффективной жидкостной хроматографией – электронно-распылительной ионизацией – масс-спектрометрией (HPLC-ESI-MS) для скрининга потенциальных антиатеросклеротических компонентов в экстракте корней володушки китайской (*Bupleurum chinense* DC.) и идентифицировали пять БАС, селективно связавшихся с клетками HepG2 [224]. Все эти исследования показывают, что выделение клеток-мишеней в сочетании с методами хроматографического анализа можно успешно применять для прогнозирования БАС в растительных экстрактах.

Подход на основе клеточных культур в полых волокнах широко используется для экстракции и идентификации активных соединений благодаря простоте, относительно высокой скорости, низкому расходу растворителя и низкой стоимости [325; 334; 225]. Результаты ряда работ с помощью клеток на основе полых волокон использовались для скрининга БАС в корнях различных видов куркумы: *Curcuma longa* L., *Curcuma wenyujin* Chen Y. H., в корнях и корневищах *Curcuma phaeocaulis* Valetton. и др. [313; 325; 334, 225; 323; 319]. В этих исследованиях живые клетки вводили в просвет волокна с помощью шприца, затем полым волокнам придавали U-образную форму и помещали их в раствор экстракта для скрининга и выявления активных соединений. Экстракт перемешивали при 37 °C в течение 3 часов, а затем полые волокна извлекали из раствора и разрывали уплотнения на обоих концах. Волокна с клеточным целевым анализом диссоциировали метанолом, центрифугировали, а затем супернатант подвергали анализу ВЭЖХ [323; 319]. Хотя этот метод

прост, быстр, эффективен и надежен, необходимо учитывать ограничения, связанные с U-образными волокнами. Их самый большой недостаток в том, что они могут создать градиент концентрации в процессе скрининга из-за разницы в плотности клеток. Чтобы избежать этой проблемы, Zhang L. S. и соавт. (2014) не придавали полым волокнам U-образную форму, а вместо этого сразу помещали их с клетками в раствор экстракта для скрининга и обнаружения активных соединений [334; 225].

В настоящее время клеточные культуры широко используются в тестах для выявления антипролиферативного действия и прогноза противоопухолевой активности БАС, что особенно актуально в свете растущей распространенности онкологических заболеваний, и, как следствие, необходимости увеличения темпов создания, разработки и тестирования новых противоопухолевых средств. При разработке лекарственных препаратов применяются преимущественно двумерные модели *in vitro*, основанные на коммерческих линиях опухолевых клеток, однако, в области доклинического скрининга возникает все больше запросов на более сложные модели, такие как трехмерные модели (в том числе органоиды), микрофлюидные системы, камера Бойдена и др. [34].

Методы с использованием в качестве тест-систем целых клеток, являются актуальными в связи с тем, что в эксперименте воссоздаются соответствующие биологические условия, максимально приближенные к реальному организму. При этом изучается влияние БАС на фенотип целых клеток. Технология высокопроизводительного фенотипического скрининга основана на использовании методов автоматизированной микроскопии и проточной цитометрии в сочетании с компьютерными системами для анализа данных [80].

Annis D. A. и соавт. (2007) доказали, что подходы на основе клеточных культур подходят для оценки биологической активности веществ, в том числе растительного происхождения, но они по-прежнему требуют длительной инкубации, что затрудняет их использование для высокопроизводительного скрининга [109].

За прошедшие годы было разработано множество современных биоаналитических методов, которые являются чувствительными, быстрыми, экономичными,

простыми в использовании и требуют меньшего расхода реагентов, чем традиционные методы. В дополнение к технологии микрофлюидных чипов, описанной в обзоре Zhuo R. J. и соавт. [341], биосенсоры представляют собой еще одну новую технологию, которую можно интегрировать в существующие методы биологического скрининга. Биосенсоры представляют собой независимые аналитические устройства, включающие в себя биологически полученный, специфичный для биоаналита элемент распознавания, связанный с датчиком, который преобразует биологический сигнал [302; 230]. Они уже играют ведущую роль в медицине и сельском хозяйстве, где используются для контроля безопасности продуктов питания, качества окружающей среды и производственных условий [260]. Можно легко сконструировать биосенсоры для стратегий биологического скрининга. Поверхностный плазменный резонанс, как высокочувствительная биосенсорная технология, успешно применяется для выявления активных веществ, например, в корнях астрагала перепончатого (*Astragalus membranaceus* [Fisch.] Bunge) и коре эвкомии вязолистной (*Eucommia ulmoides* Oliv.) [336; 259].

#### **1.4. Биотест-системы тканевого уровня**

Разработан новый класс тест-объектов: «органы-на-чипе», которые совмещают в себе преимущества как *in vivo*, так и *in vitro* моделей. «Орган-на-чипе» представляет собой многоканальный трехмерный микрофлюидный чип, позволяющий с определенным масштабированием моделировать органы, тем самым заменяя живой организм и позволяющий осуществлять поиск функциональных свойств, патологических состояний и исследований развития органов [4]. Однако, работа с ними ограничивается их высокой стоимостью и трудоемкостью процесса изготовления [115].

#### **1.5. Биотест-системы организменного уровня**

Одним из самых известных методов, позволяющих оценить БАС, является метод оценки его биологической активности в опытах *in vivo*.

Так, в Китае биологические тест-системы организменного уровня начали применять с 1950-х годов: Zhicen Lou (1953) предложил метод оценки слабительного действия, изучая влияние ревня (*Rheum L.*) на дефекацию [227]. Однако данный метод был сложным в исполнении, точность и воспроизводимость были недостаточно высокими, в следствии чего он не мог широко применяться в контроле качества РЛС [320].

Исследования БАС различного происхождения и агрегатного состояния проводят на различных биотест-объектах (мыши, крысы, кролики, кошки, обезьяны, мини-свиньи, лягушки, голуби и др.) [280; 300]. В рамках фармацевтической разработки доклинические исследования также проводятся в основном с использованием лабораторных животных, что регламентируется требованиями Руководства [86] и «Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» (утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81). Подобные биотест-системы могут имитировать физиопатологические и клинические особенности, сходные с таковыми у пациентов с хроническими и острыми заболеваниями, такими как психические расстройства [163], диабет [194; 294] и многие другие. Именно поэтому лабораторные животные являются классическими и незаменимыми моделями для изучения биологической активности, хотя такие исследования являются трудоемкими, длительными и требующими дополнительных условий для проведения экспериментов. Однако именно изучение объектов на подходящих биотест-системах предоставляет основные фармакологические данные перед последующими клиническими исследованиями на людях [326].

Традиционно, отчасти из-за достаточно высокой гомологии и сходства между геномами и физиологией млекопитающих, а также относительно короткого репродуктивного цикла, мыши и крысы используются как биотест-объекты для оценки активности лекарственных средств, в том числе растительного происхождения [127]. Их применяют для исследования лекарственных средств, так как они позволяют оценить эффективность, биодоступность, побочные эффекты и токсичность

(набор критериев ADME/T) объекта в целом организме, а также стандартно используются для исследований фармакокинетики и безопасности, которые необходимы для дальнейших клинических исследований [107; 149; 256]. Самым распространенным биологическим видом при проведении исследований являются крысы в силу практичности, сопоставимости с другими результатами, полученными для данного вида животных, и большой базы накопленных знаний по данному биологическому виду [271].

Млекопитающие-негрызуны (кролики, собаки, свиньи и обезьяны) тоже широко используются в исследованиях. Так, например, Parasuraman S. (2011) в обзоре по токсикологическому скринингу описывает, каких лабораторных животных лучше использовать в качестве тест-систем при различных токсикологических тестах [256]. Pellegatti M. (2013) рассматривает в качестве тест-объектов собак и обезьян, которых ученые применяют в доклинических исследованиях при разработке лекарственных препаратов [258], а Swindle M. M. и соавт. (2012) и van der Laan J. W. и соавт. (2010) при биомедицинских и токсикологических исследованиях показывают целесообразность использования в качестве тест-объектов свиней и минипиггов [299; 309].

Хотя модели на крупных животных связаны с ограничениями (высокая цена и более серьезные этические соображения), они по-прежнему широко используются, особенно фармацевтической промышленностью и в ветеринарии, так как нормативные руководства FDA, EMA и др. подобных международных и региональных органов власти обычно требуют тестирования безопасности минимум на 2 видах млекопитающих, в том числе на одном виде-негрызуне, до разрешения испытаний на людях [256; 309].

Действительно, белки грызунов и человека иногда проявляют разную чувствительность к биологически активным веществам [190; 204], поэтому большая уверенность в фармакологической активности может быть получена лишь при тестах на нескольких видах млекопитающих или генетически сконструированных «гуманизированных» моделях животных, если таковые имеются [162].

Foster J. R. и соавт. (2014) показали, что дополнительным фактором, расширяющим использование грызунов как моделей *in vivo* для биологического тестирования, является наличие полученных *de novo* генетически модифицированных мышей (с нокаутом генов, подавлением (нокдауном) или сверхэкспрессией интересующего белка), а также крыс, которые обеспечивают набор дополнительных подходов к изучению фармакологических эффектов [162]. Такие модели генетически модифицированных грызунов успешно применяются для проверки эффективности *in vivo* перед клиническими исследованиями, для установления новых мишеней, а также при установлении механизмов действия, что показано в работах, например, Zambrowicz В. Р. и соавт. (2003) и Zhang L. S. и соавт. (2014) [332; 334]. Получение генетически модифицированных моделей животных резко ускорилось в последнее время благодаря разработке новых методов редактирования генома TALEN и CRISPR/Cas9 [316; 326].

Vogel H. G. (2002) в своей работе отмечает, что несмотря на существующие ограничения использования лабораторных животных: мыши и крысы по-прежнему широко используются и остаются незаменимыми тест-системами в процессе разработки лекарственных средств. Однако, нужно тщательно учитывать ряд параметров: способ введения испытуемых веществ, применяемую дозу, использование установленного положительного контроля, если таковой имеется [311].

К альтернативным методам можно также отнести тест-системы организменного уровня на основе рыбок *Danio rerio* (*Zebrafish*) и нематод вида *Caenorhabditis elegans*. *Danio rerio*, как тест-объект в доклинических исследованиях, применяется в последние годы очень широко. Этому способствуют их морфологические, физиологические, биохимические, генетические и эмбриологические особенности, а также экономическая целесообразность и небольшие временные затраты на их разведение. Они применяются в скрининге при мутагенезе, оценке тератогенности и другого воздействия лекарственных средств [32]. Нематоды *C. Elegans* по сравнению с позвоночными животными имеют ряд преимуществ: они небольшие по размеру, обладают высокой продуктивностью и коротким временем генерации, у них

прозрачный покров тела, их просто содержать в лабораториях, отсутствуют биоэтические ограничения для их использования, а также есть возможность их долгосрочной криоконсервации [18; 246].

«Нематод вида *C. Elegans* используют в качестве модели нейродегенеративных заболеваний, диабета, рака, иммунных расстройств, а также для разработки и скрининга лекарственных средств для лечения перечисленных заболеваний» [18].

Применимость этих видов для моделирования болезней была дополнительно расширена недавним внедрением методов редактирования генов как у нематод [316], так и у рыбок данио-рерио [189], что позволяет быстро и малозатратно применить генную инженерию. Как пример эффективности модели скрининга рыбок данио-рерио в контексте фармакологических исследований растительных объектов можно отметить, что они недавно успешно использовались в модели стерильного повреждения тканей для устранения воспаления при скрининге 2000 соединений, включая одобренные лекарства, растительные экстракты и ингибиторы определенных метаболических путей. В результате был идентифицирован таншинон ПА (из *Salvia miltiorrhiza* Bunge), который снижает воспаление *in vivo* [275]. Эффекты, обнаруженные на нейтрофилах рыбок данио, также наблюдали на нейтрофилах человека, что подтверждает применимость этой модели для скрининга лекарств, предназначенных для лечения людей [220].

В связи с достаточно высоким сходством между геномом и физиологией млекопитающих, а также из-за относительно короткого репродуктивного цикла, традиционно для оценки активности растительных экстрактов используют модели на грызунах (мыши и крысы) [127]. Данные модели по-прежнему имеют решающее значение для оценки лекарственных средств, поскольку они предоставляют комплексные данные, включающие эффективность, биодоступность, побочные эффекты и токсичность (параметры ADME/T) препарата в целом организме [114].

Все перечисленные выше тест-системы для оценки БАС в основном различаются по своей сложности и пропускной способности, а также обладают некоторыми преимуществами и недостатками, как показано в Таблице 2.

**Таблица 2** – Преимущества и недостатки основных тест-систем для оценки биологически активных соединений

| <i>Метод</i>  | <i>Преимущества</i>   | <i>Недостатки</i>  |
|---|---|--|
| Виртуальные методы <i>in silico</i>   | Высокая пропускная способность; вещество не требуется для анализа; нет необходимости в культивировании клеток или оборудовании для лабораторных животных  | Не для всех мишеней определена пространственная структура, требуется знание структуры БАС, высокие требования к вычислительным ресурсам  |
| Методы <i>in vitro</i> с применением в качестве тест-объектов изолированных белковых структур                               | Высокая пропускная способность; нет необходимости в культивировании клеток или оборудовании для лабораторных животных   | Соединения с низкой биодоступностью не способны достигать соответствующей мишени в интактных клетках или <i>in vivo</i> .  |
| Биотест-системы на основе клеточных культур <i>in vitro</i>   | От средней до высокой производительности; демонстрируют эффективность поражений на клеточном уровне, подходят для изучения основного механизма действия   | Требуется доступ к оборудованию для культивирования клеток; сложно идентифицировать молекулярные мишени, лежащие в основе измененного фенотипа; не гарантируют эффективность <i>in vivo</i> (выявленные БАС могут не достигать мишени в условиях опытов <i>in vivo</i> , например, в результате быстрого катаболизма в печени) |
| Методы <i>in situ</i> / <i>ex vivo</i> с помощью тест-систем на основе изолированных органов или тканей                     | Высокая патофизиологическая значимость; возможность сокращения количества животных в эксперименте и обеспечение более высокой пропускной способности по сравнению с моделями на грызунах  | Более низкая пропускная способность по сравнению со скринингом на основе клеточных культур; этические проблемы, связанные с использованием животных; короткое время использования изолированных тканей и органов <i>ex vivo</i>  |
| Методы <i>in vivo</i> на основе биотест-систем организменного уровня (лабораторные животные, крупные животные)              | Высокая патофизиологическая значимость, демонстрируют активность БАС в условиях целого организма; возможность создания трансгенных моделей  | Низкая пропускная способность; этические проблемы; необходим доступ к виварию; требуется большее количество объекта исследования; возможность различий, связанных с видами (наблюдаемые эффекты могут не экстраполироваться на людей); требуется большой объем последующей работы для выявления молекулярных мишеней           |
| Биотест-систем организменного уровня с использованием в качестве тест-объектов рыбок <i>Danio rerio</i> и <i>C. elegans</i> | От средней до высокой пропускной способности благодаря возможной автоматизации; патофизиологическая значимость благодаря исследованиям в условиях целого организма; возможность создания трансгенных моделей; более низкая цена и необходимость меньшего количества объектов исследования по сравнению с моделями на грызунах | Возможность различий, связанных с видами (наблюдаемые эффекты могут не экстраполироваться на людей); этические проблемы; требуется большой объем последующей работы для выявления молекулярных мишеней   |



В настоящее время биотест-системы позволяют проводить измерения изменений в различных тест-объектах с высоким уровнем достоверности и надежности. Они позволяют упростить и ускорить процесс исследований, автоматизировать процесс измерения и исключить субъективные факторы [16].

Разработка биотест-систем представляет собой сложный процесс, который требует проведения целого комплекса технических, математических и биологических исследований: необходимо провести выбор тест-объектов для биотестирования, установить параметры для сохранения их работоспособности, определить последовательность действий при анализе, а также описать другие требования к работе для получения достоверных результатов [16].

### **Выводы по обзору литературы**

1. Анализ литературы показывает возможность использования специфических ферментных биотест-систем *in vitro* для оценки различных биологически активных соединений. На основании проведенного поиска обоснована целесообразность создания методологии формирования и применения молекулярных биотест-систем на основе ключевых/лимитирующих ферментов гомеостаза для оценки БАС различного происхождения и агрегатного состояния.

2. Из приведенных в литературном обзоре сведений видно, что наиболее изученными и востребованными являются биотест-системы организменного уровня, основанные на использовании лабораторных животных. Однако, подобные исследования трудоёмкие, дорогие, занимают много времени, требуют высокой квалификации персонала и обладают недостаточной точностью и воспроизводимостью. В связи с чем разработка более простых, быстрых и точных современных биотест-систем представляет актуальную задачу.

3. По результатам данной литературы в большинстве приведенных исследований ученые для оценки биологической активности используют один тест-объект (одну мишень). Это ограничивает количество информации, которая может быть получена в результате каждого эксперимента. Например, использование белков в качестве тест-объектов может идентифицировать только компоненты, которые с

ними связываются, и не может распознавать другие потенциально биологически активные соединения, которые могут всасываться в кровь. Актуальными являются исследования, которые направлены на разработку многоцелевых подходов для одновременного анализа нескольких активных компонентов каждого БАС для оценки его эффективности и безопасности.

4. На основе литературного обзора для проведения диссертационного исследования для разработки методологии формирования и применения СФБТС для оценки БАС отобраны следующие методы:

- *in silico* – для выбора соответствующей мишени;
- *in vitro* – специфические ферментные биотест-системы, сформированные на основе ключевых ферментов гомеостаза;
- *in vivo* – для доказательства целесообразности и достоверности применения СФБТС для оценки БАС.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Объекты исследования

**Объекты исследования** – растительные:

1) *экстракты сухие*, разработанные в ВИЛАР:

– винограда культурного (*Vitis vinifera* L.) различных сортов, красные листья [64];

– 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) –  $10,2 \pm 0,49$  % [76; 77];

– володушки золотистой (*Bupleurum aureum* L.), трава с содержанием фенольных соединений в пересчете на рутин  $8,0 \pm 0,5$  % [70];

– 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) *экспериментальных лекарственных форм*, разработанных 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 %) [83];

– таблетки для рассасывания с жидким растительным экстрактом из цветков ромашки, цветков календулы, травы тысячелистника [75],

– таблетки [73] с экстрактами листьев эвкалипта прутовидного (Эвкалимин) и травы эхинацеи пурпурной (Эстифан);

– растворы (спрей) [72; 71] с экстрактами Эвкалимина и Эстифана;

3) *препараты сравнения:*

– Антистакс<sup>®</sup> (капсулы, серия 097432001, годен до 12.2012 (эксперимент 2011 г.) Фарматон СА, Швейцария);

– Экдистен<sup>®</sup> (таблетки, серия 010116, годен до 02.18 (эксперимент 2016 г.), ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия);

– Силимар<sup>®</sup> (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;

– из гомогената лейкоцитов *тирозингидроксилазы* (ТГ) для оценки *дофаминергической активности*;

- из гомогената лейкоцитов *НАДФН-оксидазы* для оценки *иммуномодулирующей активности* БАС;
- коммерческих препаратов *каталазы* (КАТ) и *глутатионредуктазы* (ГР) для оценки антиоксидантной / антимикробной / адаптогенной активности БАС;
- коммерческих препаратов *пируваткиназы* (ПК) для оценки энергизирующей активности БАС.

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Методы *in silico*

1. Спектры биологической активности цикориевой и хлорогеновой кислот, вторичных метаболитов цикория обыкновенного, были рассчитаны с применением современной версии компьютерной программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances [158]). Программа PASS позволяет оценивать вероятности наличия и отсутствия 1957 видов биологической активности со средней точностью около 97 %. Алгоритм PASS основан на наивном байесовском классификаторе [158] и представлении структуры химических соединений в виде MNA-дескрипторов (Multilevel Neighborhoods of Atoms) [157]. Входными данными для PASS служат структуры, представленные в формате MOL или SDF [142]. Результатом компьютерного прогноза является список вероятных активностей для каждого соединения с соответствующими оценками вероятности:  $P_a$  – вероятность принадлежности соединения к классу «активные»,  $P_i$  – вероятность принадлежности соединения к классу «неактивные». Все активности, для которых расчетные значения  $P_a$  превышают  $P_i$ , рассматриваются как вероятные.

2. Анализ аддитивного/синергетического действия и возможных межлекарственных взаимодействий исследуемых химических соединений был проведен с применением компьютерной программы PharmaExpert. В основе PharmaExpert лежит база знаний, содержащая информацию о более чем 15 тысячах известных взаимосвязей между фармакологическими эффектами и механизмами действия фармакологических веществ [213].

Работа с использованием Программ PASS и PharmaExpert выполнена совместно с Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» (доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН Поройков В.В., н.с. Ионов Н.С.).

3. Молекулярный докинг: трехмерные модели конформеров цикориевой и хлорогеновой кислот, использованные в качестве начальных структур для проведения докинга, были загружены из базы данных PubChem (структуры 5281764 и 1794427 соответственно; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281764> и <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427>) и импортированы в программу Molegro Virtual Docker 6.0 (MVD) вместе со структурой фермента цитохрома CYP3A4 (PDB: 6UNJ), либо (в отдельном вычислительном проекте) – вместе со структурой фермента глутатионтрансферазы MGST1 (PDB: 2H8A). Область для поиска конформаций при докинге в цитохром P<sub>450</sub> находилась внутри сферы радиусом 10 Å, центрированной на сокристаллизованном лиганде 3. В случае глутатионтрансферазы сферическая область имела радиус 8 Å и была центрирована на лиганде 4. Для молекул 1 и 2 учитывалась их конформационная подвижность по всем одинарным химическим связям, относительно которых возможно внутреннее вращение. Геометрия ферментов считалась жесткой. Для каждого из лигандов осуществлялось по 300 проходов алгоритма MolDock с сохранением пяти конформаций, имеющих самые низкие значения MolDock Docking Score (оценочной функции Ds) [303]. Далее для них выполнялась пост-оптимизация лиганда внутри сайта связывания. Результаты, полученные для конформации с наименьшей величиной Ds, анализировали и визуализировали с использованием инструментов, встроенных в программу MVD. Работа выполнена совместно с Федеральным государственным автономным образовательным учреждением высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» (доктор химических наук, профессор Хлебников А.И.).

### 2.2.2. Методы *in vitro*

В биохимических экспериментах использовали СФБТС на основе ключевых ферментов гомеостаза, которые выбирали предварительным анализом основных БАС с помощью Программы PASS. Реактивы квалификации «хч» российского производства. Ферменты глутатионредуктаза, каталаза, лактатдегидрогеназа, пируваткиназа глутатион окисленный, никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный (НАДФН), фосфоенолпируват, никотинамидадениндинуклеотид (НАДН), Трис-НСI, динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), метилурацил, протимозин- $\alpha$  – высокоочищенные препараты фирмы «Merck KGaA» (Германия).

Измерение рН буферного раствора или доведение ее до заданного значения осуществляли с использованием рН-метр-милливольтметра фирмы «Mettler-Toledo» (Швейцария).

Скорость всех ферментативных реакций измеряли спектрофотометрически на анализаторе для клинической химии Clima MC-15 (Испания) и спектрофотометре MPS-2000 фирмы «Shimadzu» (Япония). Она зависит от концентрации объектов исследования и описывается кривой с максимумом. Результаты представлены в наиболее эффективных концентрациях действия объектов исследования на активность ключевых ферментов гомеостаза в опытах *in vitro*: 3,3 и 6,6 мкг/мл.

Скорость глутатионредуктазной реакции определяли по [120].

Приготовление раствора глутатионредуктазы: в градуированную пробирку автоматической пипеткой отбирали 50 мкл фермента. К нему добавляли 950 мкл 0,05 М трис-ЭДТА буферного раствора рН 7,4. Перемешивали стеклянной палочкой.

Приготовление рабочих растворов:

– растворяли около 0,040 г (точная навеска) глутатиона, окисленного в 2,0 мл воды очищенной ледяной, перемешивали стеклянной палочкой. Хранили полученный раствор на льду в течение 2 часов;

– растворяли около 0,030 г (точная навеска) НАДФН в 2,0 мл ледяной 0,005 Н соляной кислоты, перемешивали стеклянной палочкой. Хранили полученный раствор на льду в течение 2 часов.

Скорость каталазной реакции определяли по [40].

Приготовление рабочих растворов:

– в градуированную пробирку взвешивали около 0,100 мг (точная навеска) каталазы и приливали 1,0 мл 0,05 М трис-гидрохлорида буферного раствора pH 7,5. Раствор во время опыта постоянно держали на льду. Полученный объем разливали по 200 мкл по пробиркам типа *Eppendorf*, а затем замораживали при температуре – 20 °С. Полученные растворы хранили 1 год;

– растворяли около 4,0 г (точная навеска) молибдата аммония в 100,0 мл воды очищенной, перемешивали стеклянной палочкой. Хранили полученный раствор в темном стекле 1 месяц.

Скорость НАДФН-оксидазной реакции изучали по [143].

Приготовление 65 мМ К,Na-фосфатного буферного раствора: 1,8 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяли при перемешивании на магнитной мешалке в 200 мл дистиллированной воды; 1 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  растворяли при перемешивании на магнитной мешалке в 40 мл дистиллированной воды. В химический стакан емкостью 250 мл помещали раствор  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , при постоянном перемешивании, измеряли pH и постепенно добавляли к нему раствор  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , доводя pH до 5,5.

Приготовление рабочего раствора НАДФН: взвешивали 0,004166 г (точная навеска) НАДФН и растворяли в ледяной воде дистиллированной. Раствор во время опыта постоянно держали на льду.

Скорость тирозингидроксилазной реакции измеряли с применением метода [60].

Приготовление буферного раствора: к 0,05 М водному раствору трис (гидроксиметиламинометан) добавляли по каплям при постоянном перемешивании малеиновую кислоту, доводя pH полученного раствора до 6,15–6,20. Готовый буферный раствор хранили при температуре 2 °С не более 3 суток.

Приготовление рабочих растворов:

– в градуированную пробирку взвешивали около 0,500 мг (точная навеска) каталазы и приливали 1,0 мл 0,05 М трис-малеинового буферного раствора pH 6,2.



Раствор во время опыта - постоянно держали на льду. Полученный объем разливали по 200 мкл по пробиркам типа Eppendorf, а затем замораживали при температуре минус 20 °С. Полученные растворы хранили 1 год;

– растворяли около 0,005 г (точная навеска) оксипиридина в 10,0 мл воды очищенной, перемешивали стеклянной палочкой. Хранили полученный раствор на льду;

– растворяли 0,001 г (точная навеска) L-тирозина в 1,2 мл 0,005 Н хлористоводородной кислоте;

– растворяли 0,0025 г ДМПН<sub>4</sub> в 1,5 мл 0,005 Н хлористоводородной кислоте.

Во время проведения опыта держали емкость с раствором на льду, плотно закрытую резиновой пробкой.

Скорость пируваткиназной реакции определяли по [43].

Приготовление буферного раствора: к 0,05 М водному раствору трис (гидроксиметиламинометан) добавляли 5 мМ раствор ЭДТА. Доводили рН полученного раствора до 7,5, добавляя по каплям при постоянном перемешивании 1М хлористоводородной кислоты. Готовый буферный раствор хранили при температуре 2 °С не более 3 суток.

Приготовление рабочих растворов:

– в дистиллированной воде растворяли 0,373 г КСl и 0,0953 г MgCl<sub>2</sub> до конечной концентрации 0,1 М и 0,5 М;

– в дистиллированной воде растворяли 0,0017 г АДФ до конечной концентрации 40 мМ;

– в градуированной пробирке взвешивали 0,068 г ФЕП и растворяли в 2,0 мл воды дистиллированной;

– в градуированной пробирке взвешивали 0,0071 г НАДФН и растворяли в 1,0 мл воды дистиллированной;

– в градуированную пробирку пипеткой переменного объема отбирали 10,0 мкл пируваткиназы и добавляли 990 мкл воды дистиллированной. Хранили полученный раствор на льду;

– в градуированную пробирку отбирали 10 мкл лактатдегидрогеназы и растворяли в 9990 мкл воды очищенной. Хранили полученный раствор на льду.

Скорость конъюгации 2,4-динитрохлорбензола с восстановленным глутатионом в системе глутатионтрансферазы (ГТФ) определяли по методу W. H. Nabig [177].

Скорость реакции *n*-гидроксилирования анилина и *N*-деметилирования диметиланилина, катализируемых цитохромом P<sub>450</sub>, определяли при 37 °С по методу [22].

Содержание цитохрома P<sub>450</sub> в выделенных микросомах регистрировали спектрофотометрически [252]. Содержание общего белка определяли по методу Lowry [228].

Скорость iNOS-реакции определяли при 340 нм, используя программу кинетических исследований согласно [57].

В начале экспериментальной работы показали, что скорости всех ферментативных реакций зависят от концентрации объектов исследования (различного происхождения и агрегатного состояния) и описываются кривой с максимумом, поэтому скорость реакций определяли при внесении в инкубационную среду в опытные пробы образцов в оптимальных концентрациях.

Подтверждение антиоксидантной активности объектов проводили на моделях перекисного и осмотического гемолиза с 1%-й суспензией эритроцитов донорской крови (Ег/мл). Перекисный гемолиз эритроцитов, вызывали реактивом Фентона [87]; осмотический гемолиз – добавлением в инкубационную среду воды дистиллированной [86]. Работа выполнена совместно с Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского Отделения Российской академии наук (ИОЭБ СО РАН) (доктор медицинских наук, профессор Николаев С.М.)

*Подтверждение антимикробной активности* объектов исследования, выявленной с помощью СФБТС *in vitro*, проводили в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [86] с применением:

– культур микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* 209-P, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus vulgaris* (ATCC 6896), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)

(ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича»), *Candida albicans* (АТСС 10231) (ГосНИИГенетика); *Microsporium canis* (352) (ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии»);

– питательных сред: мясо-пептонный бульон, готовый к применению (МПБ), (Филиал «МЕДГАМАЛ» НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия);

– отраслевого стандартного образца мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-85-2020 (10 МЕ) (109 микробных тел/мл) (ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича»).

### **2.2.3. Методы *ex vivo* / *in vivo***

Работа выполнена в соответствии с Решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики ЕАЭС», Национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012 г.) и в соответствии с Федеральными законами от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и от 22.12.2014 № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств».

Эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986) и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Исследования выполняли по согласованному письменному плану и в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП). Дизайн и организация исследований направлены на решение поставленных целей и базируются на общих принципах организации исследований по доклиническому изучению фармакологических веществ на животных. Конкретные процедуры с

использованием животных до их начала рассматривались и утверждались биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР.

Эксперименты выполнены на 752 белых беспородных мышах-самцах с исходной массой тела 18,0–22,0 г, 412 нелинейных белых крысах-самцах с массой тела 180,0–200,0 г и на 18 кроликах-самцах породы «Шиншилла», массой тела 2,8–3,5 кг. Животных получали из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России и ООО «Кролинфо», содержали в условиях сертифицированного вивария ФГБНУ ВИЛАР на стандартном кормовом рационе со свободным доступом к корму (полноценный комбикорм ПК-120 для содержания лабораторных животных, ГОСТ Р 50258-92, производитель ООО «Лабораторкорм») и воде.

В качестве источника НАДФН-оксидазы и тирозингидроксилазы использовали гомогенат клеток крови кроликов, цитохрома P450 и глутатионтрансферазы – гомогенат микросом печени крыс.

#### Получение гомогената лейкоцитов

Применяли лабораторный пестиковый гомогенизатор Поттера-Эльвегейма с зазором 10 мкм. Гомогенизатор помещали в лед и растирали клетки крови (лейкоциты кролика) в течение 2–3 мин. Затем гомогенат центрифугировали при пониженной температуре (40 °С, 9000 об/мин, 15 мин). Полученный гомогенат перенесли в пробирку Эппендорфа.

В качестве источника цитохрома P<sub>450</sub> использовали микросомальную фракцию печени крыс, полученную дифференциальным центрифугированием [31]. Для этого крыс декапитировали, печень перфузировали раствором 1,15 % KCl, содержащим 5 мМ фосфатный буфер pH 7,45, 0,2 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотриэтол. Ткань гомогенизировали в том же растворе в соотношении масса/раствор=1:3 и центрифугировали в течение 20 мин при 10000 g на центрифуге (High Speed, фирмы MSE). Повторно проводили гомогенизирование и центрифугировали в тех же условиях. Объединенные супернатанты центрифугировали при 105000 g в течение 60 мин на

вакуумной центрифуге (Beckman модель L5). Полученные осадки микросом суспендировали в 100 мМ фосфатном буфере рН 7,5, содержащем 0,2 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 20%-ый раствор глицерина, и хранили при минус 20 °С.

### ***Введение веществ***

Объекты исследования изучали в условиях *in vitro* и при различных путях введения животным: внутрижелудочно, внутрибрюшинно и подкожно в виде растворов в воде или в виде взвеси в 1%-м крахмальном геле. Образцы спиртосодержащих настоек перед исследованием деалкоголизировали. Контрольные животные получали в адекватном количестве и при том же пути введения растворитель. Каждую группу опытных, контрольных или интактных животных формировали не менее, чем из десяти особей.

Расчет доз для изучения фармакологической активности объектов исследования был проведен согласно результатам скрининговых исследований и [86]. Дозу препаратов сравнения устанавливали согласно «Инструкции по медицинскому применению препарата» и коэффициенту пересчета доз для лабораторных животных [86].

### **Основные фармакологические тесты**

#### ***1. Острая токсичность***

Острую токсичность полученных экстрактов определяли по методу Кербера [86] на белых беспородных мышах-самцах с исходной массой тела 20,0–22,0 г при введении *per os* с помощью внутрижелудочного зонда в виде водных растворов или взвеси в 1%-м крахмальном геле.

#### ***2. Методы оценки нейро-психотропных свойств***

– Оценка работоспособности и выносливости крыс в тесте «Вынужденное плавание с грузом» [86]. На 4-й день эксперимента через 30 минут после введения препаратов изучали их влияние на работоспособность и выносливость на экспериментальной модели «плавание мышей с грузом 5 % от массы тела». Физическую работоспособность оценивали во время первого плавания по длительности плавания с грузом 5 % от массы тела, прикрепленного к корню хвоста крысы. Длитель-

ность плавания регистрировали секундомером с точностью до 1 с. Окончанием эксперимента считали момент, когда животное утомлялось, что проявлялось в неспособности всплыть на поверхность воды в течение 8 с или отказ животного от плавания (погружение на дно более чем на 10 с). Утомление часто сопровождалось нарушением моторно-координационной функции (вращением и заваливанием на бок в толще воды). Через 1 час отдыха животных снова заставляли плавать с тем же грузом, в тех же условиях. По результатам второго плавания и соотношению результатов второго и первого плавания для каждого животного судили о его выносливости.

– Оценка влияния на выживаемость мышей в стандартном тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией [86]. Животных помещали в герметически закрывающиеся банки объемом 0,5 л по 4 штуки одновременно. Фиксировалась длительность жизни каждого животного в банке от момента герметизации банки до последнего заметного дыхательного движения (независимо от предшествующих терминальных судорог).

– Изучение основных параметров поведения и неврологического статуса опытных животных в условиях кратковременного психоэмоционального стресса проводили на установке «открытое поле норкового типа» [86]. На 4-й день эксперимента было изучено их влияние на нервную деятельность на модели «открытое поле». Через 30 минут после последнего введения препарата крыс помещали на середину поля и наблюдали за их поведением в течение трех минут. Тест позволяет определять двигательную-ориентировочную и исследовательскую активность животных, уровень эмоциональности, выявить неврологические нарушения (дрожь, подергивания век, щек, мигания), а также аномальное поведение: стереотипию, встряхивания.

Тестирование начинали через 30–45 минут после последнего введения изучаемого экстракта и препарата сравнения.

### *3. Методы оценки противовоспалительных свойств*

– Модель острого экссудативного воспаления у мышей и крыс, вызываемого введением под апоневроз задних лап флогогенных агентов – формалина, каррагеина (Merck KGaA, Германия) [86]. Исследуемые экстракты вводили *per os* за 3 часа до введения флогогенного агента, а также через 5 и 18 часов после инициации воспаления животным опытных групп в объеме 10 мл/кг. Препарат сравнения Каллефлон® («Вифитех», Россия) вводили по аналогичной схеме. Выраженность отека оценивали через 24 часа онкометрическим методом по изменению объема лапы. Оценку антиэкссудативного эффекта проводили по формуле (7):

$$\% \text{ угнетения отека} = \frac{P_k - P_o}{P_k} \times 100, \quad (7)$$

где  $P_k$  – разность масс лап с отеком и без отека у животных контрольной группы;  $P_o$  – разность масс лап с отеком и без отека у животных опытной группы [86].

#### 4. Методы оценки антитоксических и гепатопротективных свойств

– Модель гепатита, вызываемого 4-дневным внутрижелудочным введением тетрациклина [91]. С 6-х по 10-е сутки эксперимента лабораторным животным вводили внутрижелудочно тетрациклин в дозе 500 мг/кг. Через 48 ч после последнего введения тетрациклина крыс подвергали эвтаназии в  $\text{CO}_2$ -камере и извлекали печень для дальнейшего исследования. Известно прооксидантное действие тетрациклина (ОАО «Биосинтез», Россия), связанное с индуцированием процесса образования свободных радикалов. Последние, усиливая свободнорадикальные реакции, способствуют накоплению высокотоксичных продуктов перекисного окисления липидов (гидроперекисей, кетонов, альдегидов и др.) в печени и крови, которые могут быть причиной нарушения структурной целостности мембран гепатоцитов и их органелл, снижения уровня биоэнергетики различных обменных и синтетических процессов в печени [91].

– Модель гепатита, вызываемого однократным подкожным введением масляного раствора четыреххлористого углерода ( $\text{CCl}_4$ ) (ООО «Компонент – Реактив», Россия) [86] в дозе 0,4 мл на 100 г массы тела. За час до введения  $\text{CCl}_4$  животные получали объекты исследования в разных дозах. Через 48 часов после введения  $\text{CCl}_4$  определяли активность сывороточных ферментов аланинаминотрансферазы

(АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), а также содержание холестерина,  $\beta$ -липопротеидов, общего билирубина и его фракций, концентрации белка в сыворотке крови с использованием биохимических наборов фирмы «Диакон» (Россия) и биохимического анализатора CS-T240 Dirui, (Китай).

Для оценки морфологических изменений при экспериментальном гепатите печень животных фиксировали в 10%-м забуференном нейтральном формалине с последующей стандартной спиртовой проводкой и заливкой в парафин по общепринятой методике (Коржевский, Гиляров, 2010). Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 4–6 мкм. 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 [38].

#### ***2.2.4. Математические методы***

Для *статистической обработки* полученных результатов 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 в трех и более экспериментальных группах применяли метод однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с последующим апостериорным анализом (post-hoc analysis). Значимость различий с контролем считали при  $p < 0,05$  [50; 6].

*Экономические (математические)* расчеты использованы для подтверждения целесообразности применения комплексной модели поэтапного скрининга в доклинических исследованиях. Расчет проводили на примере изучения адаптогенной активности растительных объектов с применением предлагаемого комплекс-



ного подхода в сравнении со стандартными методами фармакологического скрининга. При расчетах учитывали затраты на расходные материалы, реактивы, лабораторных животных, электроэнергию, воду, заработную плату и транспортно-заготовительные затраты.

## **Выводы по главе 2**

1. Диссертационные исследования проведены с использованием общенаучных и специальных экспериментальных методов на базе отдела экспериментальной фармакологии, отдела токсикологии и лаборатории микробиологических исследований Центра доклинических исследований ФГБНУ ВИЛАР и Научно-исследовательского Центра биомедицинских технологий.

2. Точность и надежность измерений обеспечивали проведением пробных серий дублирующих опытов и статистической обработкой полученных результатов. Минимально необходимое количество опытов *in vitro* составило от 3 до 5 повторностей, в случае экспериментов *in vivo* группы животных формировали в количестве 8 и более особей в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [86].

### **Глава 3. ФЕРМЕНТЫ В КАЧЕСТВЕ ТЕСТ-ОБЪЕКТОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО УРОВНЯ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НА ИХ ОСНОВЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ (СФБТС)**

Для оценки БАС различного происхождения и агрегатного состояния целесообразно использовать биологические методы, которые включают исследования с применением биотест-систем молекулярного, клеточного и организменного уровней. При этом акцент смещается к методам *in vitro*, так как они обладают высокой скоростью достижения результатов, а также точностью, воспроизводимостью, и являются экспресс-методами анализа.

Информационно-аналитический поиск по существующим биологическим тест-системам для оценки БАС (патентный и литературный) показал перспективность выбора в качестве тест-объектов ключевых/лимитирующих ферментов гомеостаза и необходимость формирования коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* на их основе, позволяющих на молекулярном уровне выявлять биологическую активность различных соединений.

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.

При создании СФБТС в качестве тест-объектов методом *in silico* (Программа PASS) выбирали ключевые и/или лимитирующие ферменты гомеостаза и учиты-

вали возможность получения легко фиксируемого сигнала. Для перехода от методов *in silico* к *in vitro* учитывали наиболее вероятную активность ( $P_a - P_i > 0,5$ ) БАС для выбора конкретного тест-фермента.

Необходимые условия хранения ферментов и других компонентов, необходимых для функционирования соответствующих СФБТС, отрабатывали при их тарировке и указывали в соответствующей нормативной документации (Приложения В-Ж).

### 3.1 Ферменты, используемые в качестве тест-объектов

#### 3.1.1 НАДФН-оксидаза

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

Формирование специфических ферментных биотест-систем рассмотрим на примере первичной НАДФН-оксидазной СФБТС, в качестве тест-объекта в которой выступал ключевой фермент иммунной системы – НАДФН-оксидаза.

**НАДФН-оксидаза** – ключевой фермент терминальной стадии фагоцитоза – респираторного взрыва (Рисунок 2). В спокойных не активированных клетках фермент существует в виде четырех пространственно разобщенных субъединиц и не активен.

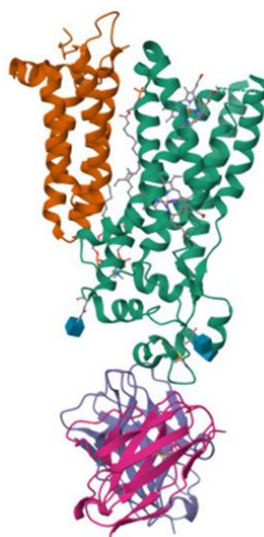
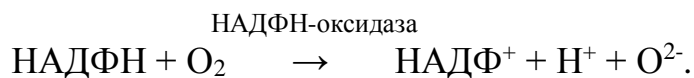


Рисунок 2 – Сгуо-ЕМ структура НАДФН-оксидазы согласно [248]

При стимуляции фагоцитоза происходит активация ферментного комплекса и окисление НАДФН:



Активный ферментный комплекс образуется в клетках при взаимодействии с иммуномодуляторами [68].

НАДФН-оксидаза представляет собой мультикомпонентную систему, состоящую из двух мембранных (gp91 и p22-phox) и двух цитоплазматических (p47 и p67-phox) субъединиц. Отсутствие одного из четырех компонентов приводит к хронической грануломатозной болезни. В неактивированных (спокойных) клетках миелоидного ряда НАДФН-оксидаза не активна, так как две субъединицы находятся в цитозоле и две – в мембранах. Сборка фермента в единый комплекс в клетках, способных к фагоцитозу, происходит в результате фосфорилирования субъединиц p47 и p67-phox миграции фосфорилированных субъединиц (p47 и p67-phox) в мембраны. В организме фосфорилирование цитозольных субъединиц НАДФН-оксидазы протеинкиназами происходит под влиянием сигнала локализованных на внешней поверхности клеточной мембраны лейкоцита рецепторов, возникающего при их взаимодействии со своими специфическими лигандами и передающегося в клетку посредством систем вторичных посредников. Образующийся в результате тетрамер представляет собой активную НАДФН-оксидазу. Эффект изменения физико-химических свойств цитозольных субъединиц НАДФН-оксидазы под влиянием их фосфорилирования воспроизводится при взаимодействии иммуноактиваторов с цитозольными субъединицами НАДФН-оксидазы гомогената лейкоцитов *in vitro*.

Используя НАДФ-оксидазу в качестве мишени был выявлен новый источник сырья для получения препаратов с иммуномодулирующей активностью – а именно, татарник колючий (*Onopordum acanthium* L.) [68].

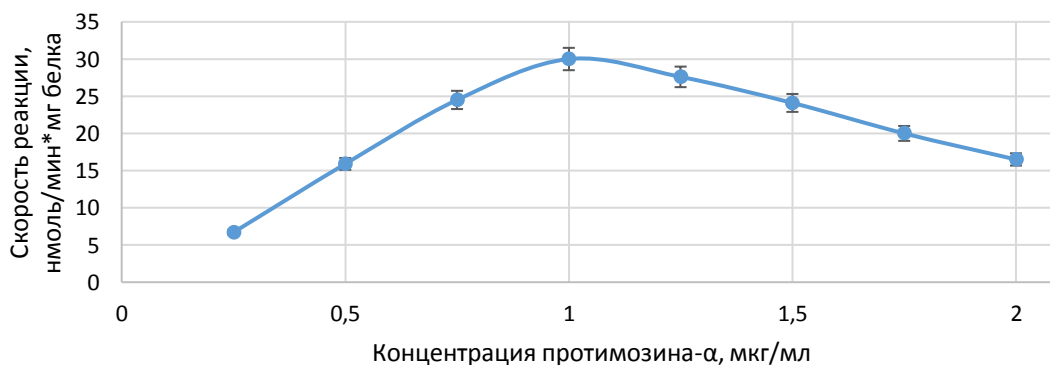
Разработана НАДФ-Н-оксидазная ферментная биотест-система *in vitro*, позволяющая выявлять наличие иммуномодулирующих свойств у изучаемого объекта,

закрывающаяся в измерении скорости НАФН-оксидазной реакции в гомогенатах свежих или хранившихся замороженными клеток миелоидного ряда – полиморфно-ядерных лейкоцитов, макрофагов без добавления иммуностимулятора и в присутствии иммуностимулятора *in vitro*.

При создании СФБТС использовали спектрофотометрическое определение активности ферментов, используя биохимический анализатор Clima MC-15, это оборудованный микропроцессором спектрофотометр, имеющий термостат на 4 кассеты по 15 ячеек каждая, перемешивающее устройство для кассеты, измерительная зона которого позволяет проводить 15 измерений в автоматическом режиме, что удобно при работе с большим количеством образцов. В состав проб входили буфер (К,Na-фосфатный), фермент (получали из гомогената клеток полиморфно-ядерных лейкоцитов), субстрат.

В качестве источника НАДФН-оксидазы при разработке СФБТС использовали не активированные белые клетки человека, для дальнейших диссертационных исследований стали использовать белые клетки крови лабораторных животных (крысы, кролики), как более доступные. Клетки выделяли, подсчитывали их число в камере Горяева, образец стандартизовали по количеству клеток в 1 мл (1 млн/мл) и замораживали при  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

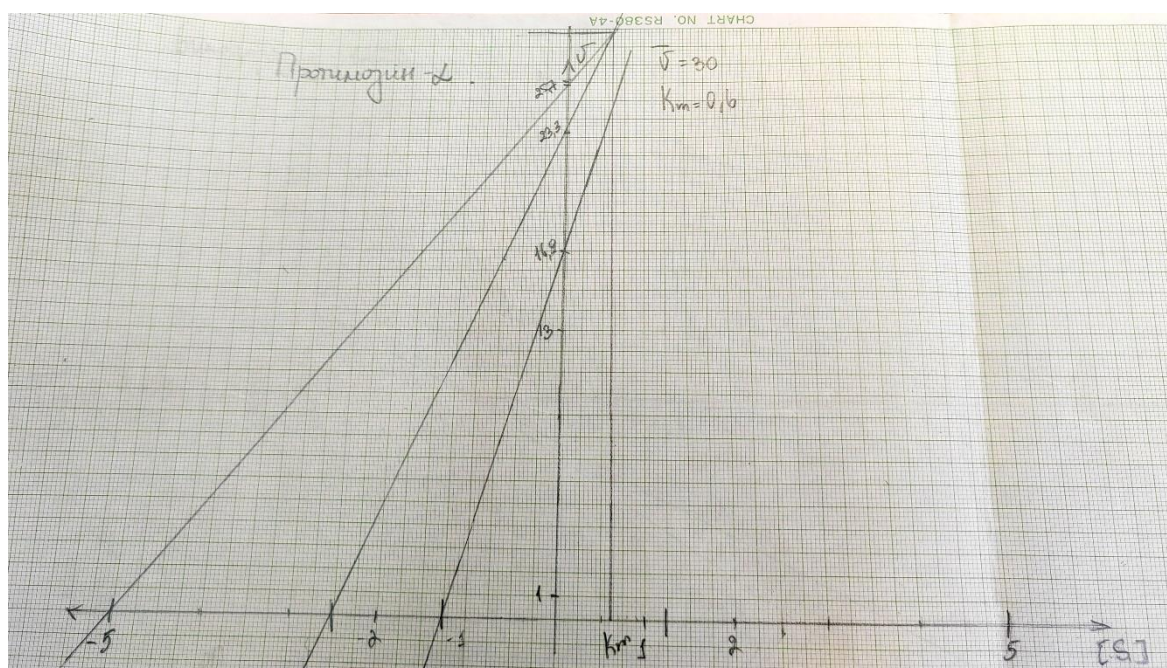
Исследуемые вещества добавляли в широком диапазоне концентраций, зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации БАС в пробе описывалась кривой с максимумом (Рисунок 3).



**Рисунок 3** – Скорость НАДФН-оксидазной реакции в гомогенатах полиморфно-ядерных лейкоцитов в зависимости от концентрации протимозина-α, мкг/мл

В ходе эксперимента получали данные, из которых для дальнейшей работы по созданию СФБТС использовали те концентрации веществ, при которых скорость реакций была максимальной. В качестве примера представлены результаты для известного иммуноактиватора протимозина- $\alpha$ , который использовали в дальнейшей работе в качестве положительного контроля при использовании первичной НАДФН-оксидазной СФБТС, оптимальная концентрация которого составляла 1,0 мкг/мл.

Результаты изучения влияния БАС на активность фермента представляли графически, используя метод Корниш-Боудена – зависимость скорости ферментативной реакции от константы Михаэлиса. Результаты представлены на Рисунке 4.



**Рисунок 4** – Кинетические параметры ферментативной реакции при добавлении протимозина- $\alpha$  к гомогенату спокойных полиморфноядерных лейкоцитов

Для определения необходимой концентрации НАДФН измеряли скорость реакции при его нескольких концентрациях при добавлении в пробу оптимальной концентрации протимозина- $\alpha$  (1,0 мкг/мл) и также определяли константу Михаэлиса и максимальную скорость реакции.

Таким образом, БАС, обладающие иммуномодулирующим действием, при их внесении в инкубационную среду, содержащую клеточный гомогенат, активируют НАДФН-оксидазу, происходит «сборка» комплекса из двух цитозольных и двух мембранных субъединиц.

Исходя из полученных результатов исследования проводили при 24 °С, а в предварительно разработанный состав проб для измерений на анализаторе для клинической химии Clima MC-15 (Испания) входили: 65 мМ К,Na-фосфатный буфер, гомогенат клеток крови кролика (1 млн/мл), субстрат 0,83 мМ НАДФН, изучаемые объекты в концентрациях 3,3 и 6,6 мкг/мл (10 и 20 мкл соответственно).

Измерения проводили по схеме (Таблица 7).

**Таблица 7** – СФБТС на основе НАДФН-оксидазы

|                  | <i>Бланк</i> | <i>Холостая</i> | <i>Контроль</i> | <i>Опыт</i> |
|------------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------|
| Буфер            | 500 мкл      | 480 мкл         | 480 мкл         | 470 мкл     |
| НАДФН            | –            | –               | 10 мкл          | 10 мкл      |
| Вещество         | –            | –               | –               | 10 мкл      |
| Гомогенат        | –            | 10 мкл          | 10 мкл          | 10 мкл      |
| H <sub>2</sub> O | –            | 10 мкл          | –               | –           |

К буферному раствору последовательно добавляли все компоненты. НАДФН добавляли последним, перемешивали. Определение поглощения проводили при 340 нм (3 измерения: одно измерение в минуту).

Контрольная проба не содержала субстрата реакции. Эффект изучаемого образца рассчитывали по убыли поглощения субстрата (НАДФН) при длине волны 340 нм за счет его окисления молекулярным кислородом. Расчеты проводили по формуле (3):

$$V = \frac{\Delta D}{\varepsilon \cdot t \cdot m}, \quad (3)$$

где  $V$  – скорость реакции, мкмоль/(мин·10 мкл гомогената клеток);  
 $\Delta D$  – измеренная убыль оптической плотности за период измерения;  
 $\varepsilon$  – молярный коэффициент экстинкции, равный 6,22 мМ<sup>-1</sup>;  
 $t$  – время проведения опыта, мин;  
 $m$  – масса гомогената в пробе, мг.



По результатам оформлен СОП 02.01.040.2022 «Определение иммуномодулирующих свойств растительных биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе НАДФН-оксидазы *in vitro*» (Приложение К).

### 3.1.2 Каталаза

Фермент каталаза (КАТ, ЕС 1.11.1.6, Рисунок 5) метаболизирует не только пероксид водорода, но и другие субстраты. В ходе ферментативной реакции, приводящей к разрушению  $\text{H}_2\text{O}_2$ , каталаза сначала окисляется до промежуточного продукта гипервалентного железа (Сдр I), которое затем восстанавливается обратно за счет второй молекулы  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Рисунок 5** – Кристаллическая структура каталазы согласно [161]

1-я реакция: Фермент (порфирин- $\text{Fe}^{\text{III}}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Сдр I}$

2-я реакция: Сдр I (порфирин $^{\text{IV}}$ - $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ ) +  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Фермент (порфирин-Fe}^{\text{III}})$   
+  $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Суммарная реакция:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Первая реакция характеризуется окислением гемовой части фермента одной молекулой  $\text{H}_2\text{O}_2$ , что приводит к образованию Сдр I, которое быстро реагирует со второй молекулой  $\text{H}_2\text{O}_2$  с образованием  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{O}_2$  [171].



Фермент содержит феррипротопорфириновую (гематиновую) простетическую группу. В состав молекулы входит 4 атома железа, что составляет 0,09% по массе. Молекулярная масса КАТ составляет около 240000. В животных тканях КАТ присутствует в печени, почках, скелетных мышцах, легких, поджелудочной железе.

В природе существует большое число ингибиторов каталазы. Уже сам пероксид водорода в высоких концентрациях приводит к инактивации фермента (субстратное торможение). Снижает активность фермента также ряд соединений (цианиды, сульфиды, азиды, фториды, и др.), которые реагируют с трехвалентным железом простетической группы [254].

Действие данного фермента характеризуется непосредственным участием простетической группы в активации субстрата. Каталаза, помимо пероксида водорода, может окислять некоторые спирты: метанол, этанол, н-пропанол, изопропанол, изобутанол, гликол и коламин. В определенных условиях фермент может также переносить кислород на фенолы и ароматические амины [173].

На основе каталазы, как тест-фермента разработана первичная специфическая ферментная биотест-система, основанная на способности пероксида водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс, то есть измерения вели по убыли перекиси водорода в процессе реакции [40].

Исследования проводили при 24 °С.

В ходе исследований определен состав пробы для исследований на анализаторе для клинической химии Clima MC-15 (Испания), при котором активность фермента оптимальна:

- каталаза (КАТ) в конечной концентрации 0,6 мкг/мл;
- 0,05 М К,Na-фосфатный буфер, рН 7,4;
- 2,4 мг/мл молибденовокислого аммония;
- 0,2 мг/мл перекиси водорода;
- изучаемые образцы в концентрациях 3,3 и 6,6 мкг/мл (10 и 20 мкл соответственно).

Контролем служила проба без добавления перекиси водорода. Холостая проба не содержала каталазы.

Подготовка проб для исследования: в кюветы объёмом 0,5 мл добавляли реагенты согласно схеме (Таблица 6).

**Таблица 6** – СФБТС на основе каталазы

|                                     | <i>Бланк</i> | <i>Холостая</i> | <i>Контроль</i> | <i>Опыт</i> |
|-------------------------------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------|
| Буфер                               | 500 мкл      | 480 мкл         | 480 мкл         | 470 мкл     |
| Каталаза                            | –            | –               | –               | 10 мкл      |
| Вещество                            | –            | –               | 10 мкл          | 10 мкл      |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,5 % | –            | 10 мкл          | 10 мкл          | 10 мкл      |
| H <sub>2</sub> O                    | –            | 10 мкл          | –               | –           |

В опытные пробы добавляли: буферный раствор pH 7,5; пероксид водорода (1,5 %); объекты исследования; каталазу.

– Инкубировали 10 минут при 37 °С.

– После инкубации вносили молибдат аммония, перемешивали. Через 10 минут определяли оптическую плотность при  $\lambda = 405$  нм.

Расчеты скорости ферментативной реакции проводили по формуле 2:

$$V = \frac{D_{\text{хол}} - D_{\text{оп}}}{\varepsilon \cdot t \cdot m}, \quad (2)$$

где V – скорость реакции, мкмоль/(мин·мг белка);

D<sub>хол</sub> – поглощение холостой пробы, мкмоль/мин·мг белка;

D<sub>оп</sub> – поглощения опытной пробы, мкмоль/мин·мг белка;

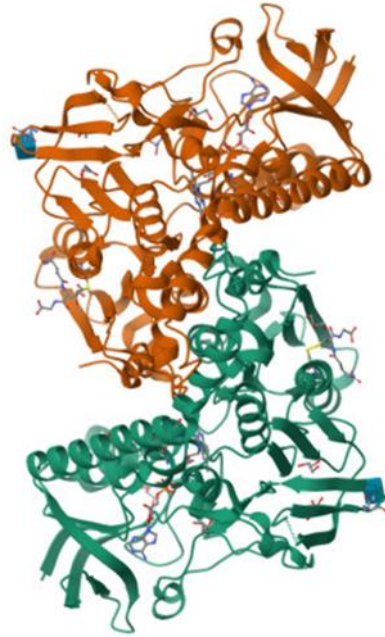
$\varepsilon$  – молярный коэффициент экстинкции, равный  $22,2 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ;

t – время инкубации, 10 мин;

m – масса фермента в пробе, 0,04 мг.

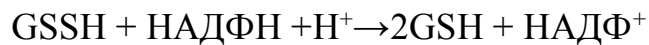
### 3.1.3 Глутатионредуктаза

Фермент **глутатионредуктаза** (ГР, ЕС 1.6.4.2, Рисунок 6) катализирует восстановление окисленного глутатиона дисульфида (GSSG) в восстановленную форму глутатион-тиол (GSH). Донором протонов является НАДФН, к которому ГР проявляет высокую специфичность [115].



**Рисунок 6** – Кристаллическая структура глутатионредуктазы согласно [329]

Данная реакция имеет следующий вид:



Ферменты мышечного сокращения относятся к тиоловым ферментам, для функционирования которых необходимы свободные (восстановленные) тиоловые (SH-) группы. Основным «защитником» тиоловых ферментов, как известно, служит восстановленный глутатион, образующийся в ГР реакции вблизи активных центров тиоловых ферментов благодаря внутриклеточной локализации ГР [139]. GSH участвует также в защите от пероксидации внутриклеточных мембранных структур, являясь косубстратом глутатионпероксидазы.

Глутатионредуктазная реакция является лимитирующим звеном восстановительного внутриклеточного глутатионового цикла, играющего исключительно важную роль в защите белков, нуклеиновых кислот, липидов, внутриклеточных мембран от оксидативного стресса. ГР необходима для поддержания высокого внутриклеточного соотношения GSH/GSSG, исполняющего регуляторную роль в контрольных механизмах процессов жизнедеятельности клетки. Восстановительный глутатионовый цикл служит защитой от оксидативного стресса не только у животных, но и у микроорганизмов и высших растений.

Молекулярная масса глутатионредуктазы составляет 100–200 кДа, он является гомодимерным флавопротеидом. Мономерная субъединица имеет от 460 до 480 аминокислотных остатков.

Наиболее высока активность ГР в почках, затем следуют тонкая кишка, печень, эндокринные железы, лёгкие, жировая ткань, головной мозг, самая низкая активность обнаружена в сердце, мышцах и эритроцитах. В клетке фермент, в основном, локализован в цитозоле, может связываться с мембранами.

Активность ГР ингибируется НАДФ, GSH и продуктами реакции. Острый стресс и различные заболевания, сопровождающиеся увеличением окислительно-восстановительных процессов, могут повышать активность ГР [310].

Разработана первичная СФБТС на основе глутатионредуктазы, основанная на измерении изменения поглощения глутатиона при 340 нм за счет окисления НАДФН эквимольным количеством восстановленного глутатиона [120].

Исследования проводили при 24 °С. Установленный предварительными исследованиями состав проб для измерений на анализаторе для клинической химии Clima MC-15 (Испания): буфер, содержащего 0,05 М Трис-НСl, 5 мМ этилендиаминтетраацетата, рН 8,0; глутатионредуктаза в конечной концентрации 0,1 мкг/мл; 3,3 мМ глутатиона окисленного; 0,1 мМ НАДФН; изучаемые образцы в концентрациях 3,3 и 6,6 мкг/мл (10 и 20 мкл соответственно). Контрольная проба не содержала глутатиона.

В кюветы объёмом 0,5 мл добавляли реагенты согласно схеме (Таблица 5).

**Таблица 5** – СФБТС на основе глутатионредуктазы

|                      | Бланк   | Контроль |                      | Опыт     |           |
|----------------------|---------|----------|----------------------|----------|-----------|
|                      |         | Холостая | Измерение активн. ГР | Холостая | Измерение |
| Буфер                | 500 мкл | 410 мкл  | 410 мкл              | 410 мкл  | 410 мкл   |
| ГР                   | –       | 10       | 10                   | 10       | 10        |
| Глутатион окисленный | –       | –        | 50                   | –        | 50        |
| Вещество             | –       | –        | –                    | 10       | 10        |
| Инкубация            |         |          |                      |          |           |
| НАДФН                | –       | 25       | 25                   | 25       | 25        |

- К 0,05 М трис-ЭДТА буферного раствора рН 7,4 добавляли ГР, перемешивали; приливали глутатион окисленный, перемешивали.
- Инкубировали 10 мин при 37 °С.
- Добавляли изучаемые образцы, перемешивали.
- Одновременно многоканальной пипеткой переменного объема вносили НАДФН.
- Определяли оптическую плотность при  $\lambda=340$  нм (делали 3 измерения: одно измерение в минуту).

Скорость реакции рассчитывали по формуле (1):

$$V = \frac{\Delta D}{\varepsilon \cdot t \cdot m}, \quad (1)$$

где V – скорость реакции, мкмоль/(мин·мг белка);

$\Delta D$  – измеренная убыль оптической плотности за период измерения;

$\varepsilon$  – молярный коэффициент экстинкции, равный 6,22 мМ<sup>-1</sup>;

t – период измерения, мин;

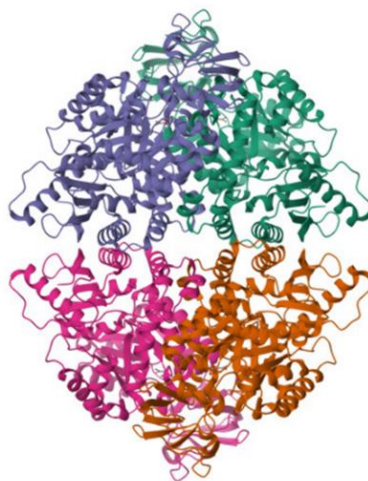
m – количество субстрата в пробе, мг.

На основе обоих ферментов: каталазы и глутатионредуктазы **разработана вторичная СФБТС на основе КАТ и ГР**, так как ранее было показано, что непосредственным угнетающим действием на ферменты антиоксидантной защиты *in vitro* обладают антимикробные средства, которые в разной степени снижают скорость глутатионредуктазной и каталазной реакций [66] при добавлении их в пробу. БАС, обладающие антиоксидантными свойствами, активируют указанные ферменты [67], а для всех веществ, проявляющих адаптогенную активность, характерным является активация глутатионредуктазы и угнетение каталазы [65].

На основании проведенных исследований оформлен СОП 02.01.039.2022 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы *in vitro*» (Приложение И).

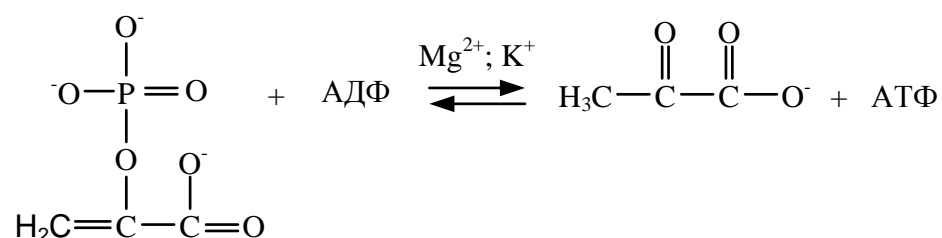
### 3.1.4 Пируваткиназа

В последние годы появились сообщения о кинетических и регуляторных свойствах **пируваткиназы** (ПК, ЕС 2.7.1.40, Рисунок 7), одного из ключевых гликолитических ферментов, который катализирует реакцию фосфорилирования аденозиндифосфата фосфоенолпируватом, при различных патологических состояниях [119; 193].



**Рисунок 7** – Кристаллическая структура пируваткиназы согласно [317]

Фермент ПК катализирует перенос богатого энергией (макроэргического) фосфатного остатка с фосфоенолпирувата на АДФ с использованием АТФ, универсального (обезличенного) энергоносителя, обеспечивающего энергией биохимические и физиологические процессы в организме, что представляет собой субстратное фосфорилирование.



Благодаря ПК энергия, образовавшаяся в процессе гликолиза (на стадии гликолитической оксидоредукции), без участия кислорода, поступает в общий энергетический фонд организма. Особенно важна роль гликолиза как поставщика энергии

при недостатке кислорода, обусловлено различными причинами. Гликолиз, как известно, служит основным поставщиком энергии при тоническом напряжении мышц, в том числе – для поддержания тонуса вен, который осуществляется за счет тонического напряжения гладкомышечных волокон стенок вен. При различных заболеваниях активность фермента резко снижается. Для оценки качества БАС, повышающих энергетический потенциал клетки за счет фосфорилирования на уровне субстрата, необходимо изучить их влияние на активность пируваткиназы.

**Разработана первичная СФБТС на основе пируваткиназы**, позволяющая оценивать энергизирующие свойства различных БАС за счет спектрофотометрического определения убыли поглощения восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАДН) при 340 нм в сопряженной лактатдегидрогеназной системе [43].

Исследования проводили при 24 °С. В результате предварительных исследований сформирован состав проб для измерений на анализаторе для клинической химии Clima MC-15 (Испания): 420 мкл трис-ЭДТА буферного раствора (рН 7,5), 10 мкл 0,1 М хлорида магния, 10 мкл 0,5 М калия хлорида, 10 мкл 40 мМ АДФ, 10 мкл 0,1 М фосфоенолпирувата, 10 мкл 10 мМ НАДН, 10 мкл лактатдегидрогеназы (0,002 единицы в конечной концентрации), 10 мкл пируваткиназы (0,002 единицы в конечной концентрации). После добавления вещества производили инкубацию в течение 10 мин при температуре 25 °С. Перемешивали и проводили измерение поглощения при 340 нм.

Измерения проводили по схеме (Таблица 9).

К буферному раствору последовательно добавляли все компоненты. После добавления исследуемого вещества инкубировали реакционную смесь в течение 10 мин при температуре 25 °С. Перемешивали и производили определение поглощения при 340 нм.

Контрольная проба не содержала пируваткиназы. Холостая проба не содержала исследуемых веществ.

**Таблица 9** – СФБТС на основе пируваткиназы

|                      | <i>Бланк</i> | <i>Холостая</i> | <i>Контроль</i> | <i>Опыт</i> |
|----------------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------|
| Буферный раствор     | 500 мкл      | 430 мкл         | 420 мкл         | 440 мкл     |
| MgCl <sub>2</sub>    | –            | 10 мкл          | 10 мкл          | 10 мкл      |
| KCl                  | –            | 10 мкл          | 10 мкл          | 10 мкл      |
| АДФ                  | –            | 10 мкл          | 10 мкл          |             |
| Фосфоенолпируват     | –            | 10 мкл          | 10 мкл          |             |
| НАДН                 | –            | 10 мкл          | 10 мкл          | 10 мкл      |
| Лактатдегидрогеназа  | –            | 10 мкл          | 10 мкл          | –           |
| Исследуемое вещество | –            | –               | 10 мкл          |             |
| Пируваткиназа        | –            | 10 мкл          | –               |             |

Расчеты проводились по формуле (6):

$$V = \frac{\Delta D}{\varepsilon \cdot t \cdot m}, \quad (6)$$

где  $\Delta D$  – убыль поглощения за время опыта, мкмоль/мин·мг белка;

$\varepsilon$  – молярный коэффициент экстинкции, мМ<sup>-1</sup>;

$t$  – время проведение опыта, мин;

$m$  – масса фермента в пробе, мг.

Сочетая биотест-системы на основе каталазы, глутатионредуктазы и пируваткиназы разработали вторичную СФБТС для оценки венотропной активности БАС, которую обычно изучают на различных моделях, как правило *ex vivo* (на изолированных венах) или с использованием лабораторных животных.

По результатам проведенных исследований оформлен СОП 02.01.043.2023 «Определение венотонизирующих свойств биологически активных веществ с применением комплекса специфических ферментных биотест-систем *in vitro*» (Приложение П).



### 3.1.5 Тирозингидроксилаза

Для оценки дофаминергической активности БАС целесообразно использовать в качестве тест-фермента тирозингидроксилазу (Рисунок 8), позволяющую избирательно выявлять вещества, обладающие непосредственным средством к дофаминергической нейромедиаторной системе [59].

Ее специфичность обусловлена наличием одинаковых участков «узнавания» у дофаминовых рецепторов и тирозингидроксилазы, обеспечивающих избирательное связывание с лигандами, проявляющееся в условиях данного опыта снижением активности последней. Фермент тирозингидроксилаза является лимитирующим и ключевым звеном дофаминовой нейромедиаторной системы, играющей важную роль не только в функционировании центральной нервной системы в целом, но и в нейрогормональной регуляции обмена веществ, в том числе – в нейроэндокринной регуляции потенции. Тирозингидроксилаза обладает специфическим средством к агонистам, антагонистам и аллостерическим регуляторам дофаминовых рецепторов, что позволяет использовать этот фермент для выявления дофаминергических веществ, в данном случае – веществ, участвующих в нейроэндокринной регуляции полового акта. К веществам, подавляющим синтез пролактина в организме, относится дофамин, который угнетает синтез гормона в передней доле гипофиза и экспрессию гена пролактина, а также стимулирует «аутопереработку» молекул пролактина [59]. Поэтому использование в качестве тест-фермента тирозингидроксилазы является целесообразным для оценки дофаминергической активности различных БАС.

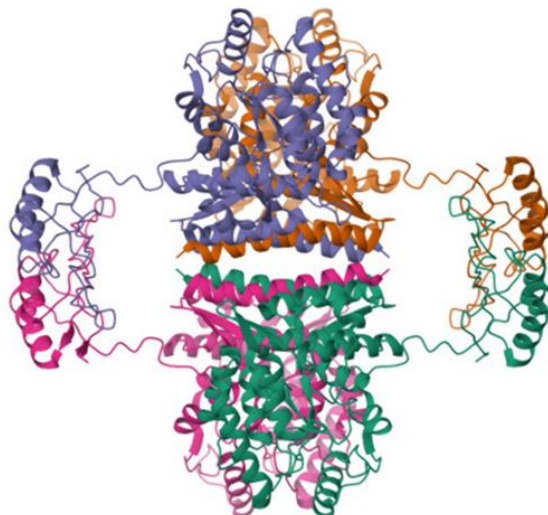


Рисунок 8 – Структура тирозингидроксилазы согласно [124]

Используя в качестве мишени фермент тирозингидроксилазу, являющуюся неотъемлемой частью дофаминовой нейромедиаторной системы, *in vitro* выявили специфическое сродство белково-пептидных препаратов из омелы белой (*Viscum album* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Эти результаты послужили основанием для изучения психотропной, в том числе стресс-протективной, активности препаратов из омелы белой и пшеницы. Последующие исследования на животных позволили установить их анксиолитическую, стресс-протективную активность и классифицировать их как избирательные анксиолитики [82].

**Разработана первичная СФБТС на основе тирозингидроксилазы с применением метода [60], за счет измерения прироста поглощения при 335 нм, обусловленного окислением 6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптерина (ДМПН<sub>4</sub>) в ДМПН<sub>2</sub>, сопряженным с превращением субстрата реакции L-тирозина в L-диоксифенилаланин (L-ДОФА) и выражали в нмоль/мин·мг белка. Состав проб для измерений на анализаторе для клинической химии Clima MC-15 (Испания) и спектрофотометре MPS-2000 фирмы «Shimadzu» (Япония): 440 мкл трис-малеинового буфера (рН 6,2), 10 мкл 0,5 мг/мл каталазы, 10 мкл 0,5 мг/мл 3-окси-6-метил-2-этил-пиридина гидрохлорида, 10 мкл 1 мг/мл L-тирозин (в 0,005 Н HCl), 10 мкл 1,67 мг/мл ДМПН<sub>4</sub> (в 0,005 Н HCl).**

Скорость тирозингидроксилазной реакции определяли по схеме (Таблица 8).

**Таблица 8** – СФБТС на основе тирозингидроксилазы

|                      | <i>Бланк</i> | <i>Холостая</i> | <i>Контроль</i> | <i>Опыт</i> |
|----------------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------|
| Буферный раствор     | 500 мкл      | 460 мкл         | 450 мкл         | 440 мкл     |
| Гомогенат лейкоцитов | –            | 10 мкл          | 10 мкл          | 10 мкл      |
| L-тирозин            | –            | –               | 10 мкл          | 10 мкл      |
| Каталаза             | –            | 10 мкл          | 10 мкл          | 10 мкл      |
| Эмоксипин            | –            | 10 мкл          | 10 мкл          | 10 мкл      |
| ДМПН <sub>4</sub>    | –            | 10 мкл          | 10 мкл          | 10 мкл      |
| Исследуемое вещество | –            | –               | –               | 10 мкл      |

Кювета сравнения содержала те же компоненты, что и кювета измерения, за исключением L-тирозина. Реакцию инициировали добавлением ДМПН<sub>4</sub> одновременно в обе кюветы. Изучаемые образцы добавляли к полной системе, одновременно в обе кюветы, после одноминутного прописывания скорости реакции, на линейном участке скорости. При рН 6,2 изобестическая точка находится при 335 нм. Коэффициенты молярной экстинкции для ДМПН<sub>4</sub> и ДМПН<sub>2</sub> – 1250 и 5300 соответственно.

Так как во время ферментативной реакции поглощение ДМПН<sub>2</sub> измеряли в присутствии ДМПН<sub>4</sub>, для расчетов скорости реакции использовали разностный коэффициент молярной экстинкции, формула (4)

$$D = E_{\text{ДМПН}_4}(C_{\text{ДМПН}_4} - C_{\text{ДМПН}_2}) + E_{\text{ДМПН}_2}C_{\text{ДМПН}_2}, \quad (4)$$

где  $D$  – оптическая плотность;

$C$  – концентрация, мг/мл;

$E$  – коэффициент молярной экстинкции.

Вносили поправку на неферментативное окисление ДМПН<sub>4</sub>. Учитывая, что кювета сравнения содержит те же вещества, что и кювета измерения, за исключением субстрата, для внесения этой поправки вычитали прирост поглощения, обусловленный неферментативным окислением ДМПН<sub>4</sub> (показания кюветы сравнения). Таким образом, измеряемая величина представляет собой прирост поглощения за счет образования ДМПН<sub>2</sub> во время ферментативной реакции.

Скорость тирозингидроксилазной реакции рассчитывали на 1 мл гомогената лейкоцитов, формула (5):

$$v = \frac{(D - D_{\text{ДМПН}_4}) \cdot 60 \cdot 1000}{(E_{\text{ДМПН}_2} - E_{\text{ДМПН}_4}) \cdot t \cdot 10'} \quad (5)$$

где  $v$  – скорость тирозингидроксилазной реакции, мкмоль/(мин·10 мкл гомогената клеток);

$D - D_{\text{ДМПН}_4}$  – прирост поглощения за счет ферментативного окисления  $D - D_{\text{ДМПН}_4}$  при данной длине волны;

$E_{\text{ДМПН}_2} - E_{\text{ДМПН}_4}$  – разностный коэффициент молярной экстинкции;

$t$  – период измерения, с,

60 – коэффициент пересчета секунд в минуты,

10 – количество гомогената лейкоцитов в пробе, мкл,

1000 – коэффициент пересчета на 1 мл гомогената.

По результатам исследования оформлен СОП 02.01.042.2022 «Определение скорости тирозингидроксилазной реакции методом прямого спектрофотометрического измерения» (Приложение М).

### **3.1.6 Цитохром P<sub>450</sub>**

Одним из важнейших путей регуляции клеточного метаболизма является управление функциональным состоянием мембраносвязанных ферментов. Многочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют, что одним из механизмов удаления ксенобиотиков является их окисление. Увеличение полярности гидрофобных молекул способствует переходу неполярных веществ из гидрофобного пространства мембран в водное пространство клетки. В этом плане особый интерес представляют цитохромы P<sub>450</sub> (Рисунок 9), гем-содержащие ферменты, участвующие на первых этапах метаболизма лекарственных средств и ксенобиотиков [61; 273].



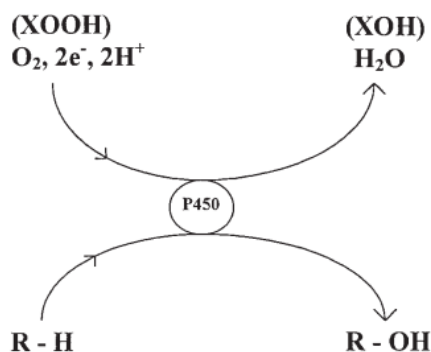
**Рисунок 9** – Кристаллическая структура цитохрома P<sub>450</sub> (CYP3A4) согласно [327]

Последствия взаимодействия ксенобиотиков с цит P<sub>450</sub> не однозначны и зависят как от структуры ксенобиотика, так и от изоформы ферментов. Поэтому возникает необходимость изучения регуляции активности фермента: его активации для детоксикации токсичного вещества, либо его ингибирования в случае попадания в организм ксенобиотика с потенциальными мутагенными и канцерогенными свойствами.

**Цитохром P<sub>450</sub>** (цит P<sub>450</sub>) представляет собой комплекс, состоящий из белка и железосвязывающей системы. Основной функцией цитохрома P<sub>450</sub> является образование гидрофильных метаболитов токсических веществ, способствующих их последующему элиминированию из организма [233].

Цитохромы катализируют различные виды окислительных реакций: гидроксирование, сульфоксидирование, деметилирование и деалкилирование, дезаминирование, дегалогенирование, эпоксидирование и пероксидирование субстратов [61].

Суммарное уравнение реакции гидроксирования вещества RН ферментами микросомального окисления выглядит следующим образом (Рисунок 10).



**Рисунок 10** – Схема реакций цитохрома P<sub>450</sub> согласно [110]. R–H, субстрат; R–OH, гидроксированный продукт; XO OH, пероксид (X = H или органический остаток); XOH, гидроксированный побочный продукт

Процесс гидроксирования проходит в 5 стадий [233]:

- 1) связывание окисленной формы цит P<sub>450</sub> с субстратом;
- 2) восстановление образовавшегося фермент-субстратного комплекса в НАДФН-специфичной цепи переноса электронов;
- 3) образование тройного комплекса: восстановленный цит P<sub>450</sub> – субстрат – кислород

4) активирование молекулярного кислорода в этом комплексе путем его восстановления;

5) распад комплекса на окисленный цит P<sub>450</sub> и окисленный субстрат с сопутствующим образованием гидроксила.

Из 57 изоформ CYP, описанных у человека, большинство экспрессируется в печени: CYP1A1 – до 1 % от общего количества цитохромов печени, 1A2 – до 16 %, 2A6 – до 14 %, 2B6 – до 5 %, 2C8 – до 7,5 %, 2C9 – до 29 %, 2C19 – до 4 %, 2D6 – до 4 %, 2E1 – до 16 %, 2J2 – до 1 %, 3A4 – до 37 %, 3A5 – до 1 % [61].

Ранее при сравнительном изучении активности различных изоформ цит P<sub>450</sub> из печени лабораторных животных (крыс, мышей, кроликов, собак и др.) и человека было показано, что профиль продуктов окисления ксенобиотиков у человека отличается от данного параметра у опытных животных [178]. При этом I стадия детоксикации ксенобиотика осуществляется с помощью более чем 50 изоформ цит P<sub>450</sub> [221] и «рациональных подходов к предсказанию субстратной специфичности изоферментов P<sub>450</sub> не существует, за исключением структурных аналогий с известными субстратами и формального сравнения размеров полостей активного центра, которые накладывают стерео-ограничения на размер молекул субстрата [24].

Разработана первичная СФБТС на основе цитохрома P<sub>450</sub>, выделенного из микросом печени крыс. Скорость реакции *n*-гидроксилирования анилина и N-деметилирования диметиланилина, катализируемых цитохромом P<sub>450</sub>, определяли при 340 нм по убыли НАДФН при окислении в процессе реакции при 37 °С [22].

Монооксигеназную активность цитохрома P<sub>450</sub> определяли с использованием субстрата I типа – диметиланилина (реакция N-деметилирования диметиланилина) и субстрата II типа – анилина (реакция N-гидроксилирования) [28]. Концентрация НАДФН в пробе составляла 0,3 мМ, анилина и диметиланилина – 3 мМ, микросом – 1 мг/мл.

Добавляли в кюветы спектрофотометра исследуемые пробы согласно схеме (Таблица 10) для проведения измерений на спектрофотометре MPS-2000 фирмы «Shimadzu» (Япония).

**Таблица 10** – СФБТС на основе цитохрома P<sub>450</sub>

|   | <i>Кювета сравнения</i> | <i>Кювета измерения</i> |
|---|-------------------------|-------------------------|
| Буфер   | 2,8                     | 2,8                     |
| Суспензия микросом  | 0,1                     | 0,1                     |
| Субстрат анилин (3мМ раствор) или диметилаланин (3мМ раствор) | 0,1                     | 0,1                     |
| НАДФН (3мМ раствор)   | –                       | 0,01                    |

Проводили измерение скорости ферментативной реакции без добавления изучаемых веществ (контроль) и после их добавления (опыт) в кинетическом режиме, при 340 нм, в течение 3 минут.

### 3.1.7 Глутатионтрансфераза

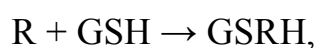
**Глутатионтрансфераза** (ГТФ, ЕС 2.5.1.18, Рисунок 11) также, как и цитохром P<sub>450</sub> участвует в метаболизме ксенобиотиков, обеспечивает увеличение гидрофильности и уменьшение токсичности ксенобиотиков, имеющих в своем составе полярную группу, способствует их быстрому выведению из организма [279].



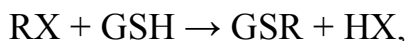
**Рисунок 11** – Кристаллическая структура глутатион-S-трансферазы согласно [249]

Химическая модификация ксенобиотиков с участием ГТФ, может осуществляться тремя различными способами:

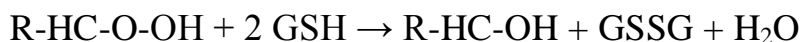
1) путём конъюгации субстрата R с глутатионом:



2) в результате нуклеофильного замещения:



3) восстановления органических пероксидов до спиртов:



На сегодняшний день идентифицированы 16 цитозольных и 6 микросомальных изоформ глутатионтрансферазы. Известно, что активация ГТФ является адаптивной реакцией на химический стресс внутри клетки [238]. Таким образом, понимание того, как БАС влияют на активность ГТФ, может быть очень полезным с терапевтической точки зрения. Кроме того, фермент участвует в развитии лекарственной устойчивости [208].

Разработана СФБТС на основе ГТФ. Скорость конъюгации 2,4-динитрохлорбензола с восстановленным глутатионом в системе глутатионтрансферазы определяли в 1-см кювете при 27 °С по нарастающую поглощения при 340 нм вследствие образования продуктов конъюгации динитрохлорбензола (ДНХБ) и восстановленного глутатиона (GSH) по методу W. H. Nabig [177].

Концентрация ДНХБ в пробе составляла 0,7 мМ, GSH – 1 мМ, микросомального белка – 0,15 мг/мл.

Добавляли в кюветы спектрофотометра исследуемые пробы согласно схеме (Таблица 11) для измерений на спектрофотометре MPS-2000 фирмы «Shimadzu» (Япония).

**Таблица 11** – СФБТС на основе глутатионтрансферазы

| <i>Ингредиент</i>                          | <i>Кювета сравнения</i> | <i>Кювета измерения</i> |
|--|-------------------------|-------------------------|
| Буфер                                      | 2,9                     | 2,9                     |
| Суспензия микросом, 0,15 мг белка/мл пробы | 0,1                     | 0,1                     |
| Субстрат 2,4-динитрохлорбензол             | 0,1                     | 0,1                     |
| Глутатион восстановленный                  | -                       | 0,01                    |

Проводили измерение скорости ферментативной реакции без добавления изучаемых веществ (контроль) и после их добавления (опыт) в кинетическом режиме, при 340 нм, в течение 3 минут.



Одним из наиболее важных проявлений гепатопротективного действия БАС является их способность активировать ферменты детоксикационной системы человека, участвующих в биотрансформации и выведении ксенобиотиков. Данная система включает множество ферментов, однако к ключевым из них относятся цитохром P<sub>450</sub> и глутатионтрансфераза [33]. В связи с чем, **разработана вторичная СФБТС на основе цитохрома P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазы**, позволяющая оценивать антитоксическое действие БАС.

На основе полученных результатов оформлен СОП 02.01.041.2022 «Определение антитоксических свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе цитохрома P450 и глутатионтрансферазы *in vitro*» (Приложение Л).

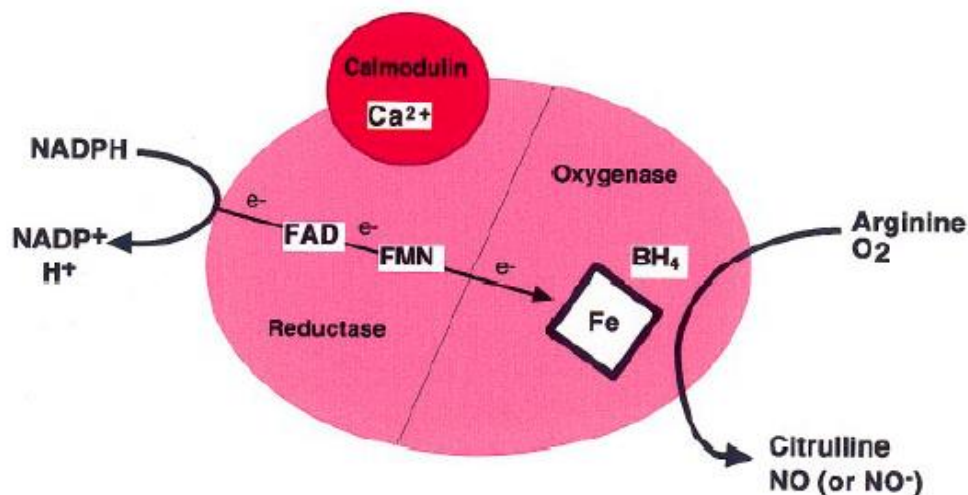
### 3.1.8 Индуцибельная NO-синтаза

NO-синтазы классифицируют на 3 типа: нейрональную (nNOS), **индуцибельную** (iNOS, Рисунок 12) и эндотелиальную (eNOS) [43]. Известно, что индуцибельная NO-синтаза (iNOS, EC 1.14.13.39) не активна при физиологических условиях, а экспрессируется и активируется при воспалении в клетках макрофагов, нейтрофилах, гепатоцитах, мезангиальных и других клетках [35; 56; 94].



**Рисунок 12** – Кристаллическая структура индуцибельной NO-синтазы с ингибитором согласно [159]

NO-синтаза катализирует превращение L-аргинина в цитруллин и оксид азота (NO), который функционирует в биосистемах как высокоэффективный регулятор метаболизма [106; 342]. Схема превращения представлена на Рисунке 13.



**Рисунок 13** – Схема катализируемой NO-синтазой реакции согласно [106]

Процесс окисления терминального азота L-аргинина до цитруллина происходит при участии железосодержащего протопорфирина IX в активном центре, фламинуклеотида (FMN), фламинадениндинуклеотида (FAD) и тетрагидроптерина (BH<sub>4</sub>) в качестве коферментов, а также O<sub>2</sub> и НАДФН как косубстратов [36].

**Разработана первичная СФБТС на основе индуцибельной NO-синтазы** для оценки противовоспалительных свойств БАС.

Скорость iNOS-реакции определяли при 340 нм, используя программу кинетических исследований согласно [57].

Состав опытных проб: 50 мМ буферного раствора HEPES с 1 Мм ацетатом магния pH 7,4; 0,5 мМ раствора L-аргинина; раствор дитиотреитола; раствор тетрагидроптерина; объекты исследования; iNOS; раствор оксигемоглобина.

Реагенты для измерения на спектрофотометре MPS-2000 фирмы «Shimadzu» (Япония) добавляли согласно схеме (Таблица 12).

Холостые пробы не содержали НАДФН. В контрольную пробу не добавляли раствор объекта исследования.

После инкубации проб в течение 3 минут при температуре 37 °С реакцию запускали путём внесения в кювету измерения раствора НАДФН непосредственно перед измерением оптической плотности на спектрофотометре.

**Таблица 12** – СФБТС на основе индуцибельной NO-синтазы

|  | <i>Контроль</i> |          | <i>Опыт</i> |          |
|--|-----------------|----------|-------------|----------|
|  | Холостая        | Опытная  | Холостая    | Опытная  |
| Буферный раствор 50мМНЕРЕ8с ацетатом магния, рН7,4 | 2740 мкл        | 2640 мкл | 2720 мкл    | 2620 мкл |
| Аргинин  | 100 мкл         | 100 мкл  | 100 мкл     | 100 мкл  |
| Дитиотриэтол                                       | 100 мкл         | 100 мкл  | 100 мкл     | 100 мкл  |
| Диметил-тетро гидроптерин                          | 10 мкл          | 10 мкл   | 10 мкл      | 10 мкл   |
| Объект исследования                                | –               | –        | 20 мкл      | 20 мкл   |
| Фермент iNOS                                       | 20 мкл          | 20 мкл   | 20 мкл      | 20 мкл   |
| Оксигемоглобин                                     | 30 мкл          | 30 мкл   | 30 мкл      | 30 мкл   |
| НАДФН  | –               | 100 мкл  | –           | 100 мкл  |

На основании проведенных работ оформлен СОП 02.01.038.2021 «Определение противовоспалительных свойств растительных биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе индуцибельной NO-синтазы (iNOS) *in vitro*» (Приложение Н).

### **3.2 Биологическая коллекция специфических ферментных биотест-систем *in vitro***

Для оценки целевой биологической активности изучаемого образца, который может быть, как индивидуальным веществом, так и объектом сложного состава, применяют определенную СФБТС, которая позволяет охарактеризовать определенный вид биологической активности. 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 разработано и утверждено директором ФГБНУ ВИЛАР Положение о Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (Приложение А). Целью работы с Биокolleкцией (БК-СФБТС) является сохранение перспективных специфических ферментных биотест-систем *in vitro* для проведения на молекулярном уровне фундаментальных медико-биологических исследований. Задачами БК-СФБТС является:

- хранение и отбор биотест-систем *in vitro*, участвующих при проведении испытаний БАС, разработанных в ФГБНУ ВИЛАР;
- сохранение специфических ферментных биотест-систем, имеющих утвержденный и зарегистрированный в ФГБНУ ВИЛАР СОП (Приложения И–П) и входящие в Реестр СФБТС (Приложение Б).

На сегодняшний день в утвержденный Реестр СФБТС (Таблица 13, Приложение Б) входят 5 первичных и 5 вторичных СФБТС и работы по его пополнению продолжаются.

**Таблица 13** – Реестр первичных и вторичных специфических ферментных биотест-систем

| №  | Название биотест-системы <i>in vitro</i>   | Выявляемые свойства БАВ   | Нормативные документы  |
|----|--|---------------------------|--|
| 1  | 2  | 3                         | 4  |
| 1. | Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы | Адаптогенные свойства БАВ | 1. Патент № 2181890. «Способ выявления веществ, обладающих адаптогенными свойствами, <i>in vitro</i> ». Быков В. А., Минеева М. Ф., Дубинская В. А., Ребров Л. Б., Колхир В. К.<br>2. СОП 02.01.039.2022 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы <i>in vitro</i> », 11 стр. |

## Продолжение таблицы 13

| 1  | 2   | 3   | 4  |
|----|---|---|--|
| 2. | Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы-тазы | Антиоксидантные свойства БАВ                  | 1. Патент РФ № 2181892. «Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, <i>in vitro</i> » Быков В. А., Дубинская В. А., Минеева М. Ф., Ребров Л. Б.; Колхир В. К.<br>2. СОП 02.01.039.2022 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы <i>in vitro</i> », 11 стр.                  |
| 3. | Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы      | Антимикробные свойства БАВ                    | 1. Патент № 2181891. «Способ выявления веществ, обладающих противомикробными и противовирусными свойствами, <i>in vitro</i> » Быков В. А., Дубинская В. А., Минеева М. Ф., Ребров Л. Б., Колхир В. К.<br>2. СОП 02.01.039.2022 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы <i>in vitro</i> », 11 стр. |
| 4. | Первичная НАДФН-оксидазная ферментная биотест-система <i>in vitro</i>                             | Иммуномодулирующие свойства БАВ               | 1. Патент № 2194077. «Способ выявления веществ с потенциальной иммуномодулирующей активностью <i>in vitro</i> с применением НАДФН-оксидазной тест-системы» Быков В. А., Минеева М. Ф., Попова Н. Б.<br>2. СОП 02.01.040.2022 «Определение иммуномодулирующих свойств растительных биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе НАДФН-оксидазы», 6 стр.   |
| 5. | Первичная тирозингидроксилазная ферментная биотест-система <i>in vitro</i>                        | Дофаминергические (нейротропные) свойства БАВ | 1. СОП 02.01.042.2022 «Определение скорости тирозингидроксилазной реакции методом прямого спектрофотометрического измерения», используемые в экспериментальных исследованиях», 5 стр.  |
| 6. | Первичная пируваткиназная ферментная биотест-система <i>in vitro</i>                              | Энергизирующие свойства БАВ                   | 1. Методика: «Выявление активаторов субстратного фосфорилирования в объектах растительного происхождения путем определения скорости пируваткиназной реакции на биохимическом анализаторе «Сlima М-15» для исследований по направленному поиску и созданию венотонизирующих средств». М. ГНУ ВИЛАР, 2010 - 5стр.  |
| 7. | Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе глутатионредуктазы и пируваткиназы | Венотонизирующие свойства БАВ                 | 1. СОП 02.01.037.2021 от 12.12.2024 «Определение венотонизирующих свойств биологически активных веществ с применением комплекса специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> », 6 стр.  |

Продолжение таблицы 13

| 1   | 2  | 3  | 4  |
|-----|--|--|--|
| 8.  | Вторичная биотест-система на основе цитохрома P <sub>450</sub> и глутатионтрансферазы          | Выявление БАВ с анти-токсическими свойствами | 1. Патент РФ № 2316597 «Способ выявления анти-токсических свойств биологически активных веществ» Быков В. А., Минеева М. Ф., Стрелкова Л. Б., Колхир В. К., Ребров Л. Б.<br>2. СОП 02.01.041.2022 «Определение антитоксических свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе цитохрома P <sub>450</sub> и глутатионтрансферазы <i>in vitro</i> », 6 стр. |
| 9.  | Первичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе индуцибельной NO-синтазы (iNOS) | Противовоспалительные свойства БАВ           | 1. Методика: «Выявление противовоспалительных свойств БАВ с помощью ферментной биотест-системы <i>in vitro</i> на основе индуцибельной NO-синтазы» № М04868244-37-2014. М. ФБГНУ ВИЛАР, 2014 г., 19 стр.<br>2. СОП 02.01.038.2021 «Определение противовоспалительных свойств биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе индуцибельной NO-синтазы <i>in vitro</i> », 10 стр.                |
| 10. | Первичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе тиреопероксидазы                | Тиреотропные свойства БАВ                    | 1. СОП 02.01.037.2020, «Определение тиреотропных свойств биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-систем на основе тиреопероксидазы (ТПО) <i>in vitro</i> », 10 стр.   |

Порядок работы с их использованием отражен в разработанных нормативных документах:

- 1) «Метод расширения БК-СФБТС», М-04868244-111-2024 (Приложение В);
- 2) «Метод характеристики единиц хранения БК-СФБТС», М 04868244-110-2024 (Приложение Г);
- 3) СОП 02.01.054-2024 «Коррекция нарушений качества единиц хранения БК-СФБТС» (Приложение Д);
- 4) СОП 02.01.056-2024 «Поддержание единиц хранения БК-СФБТС» (Приложение Е);
- 5) СОП 02.01.055-2024 «Контроль качества единиц хранения БК-СФБТС» (Приложение Ж).

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. [19].

### **3.4 Создание методологии формирования и применения специфических ферментных биотест-систем**

Этапы диссертационного исследования представлены на Рисунке 14.

В экспериментальном блоке оценки БАС по его биологическим характеристикам можно выделить следующие методы: *in silico* (Программа PASS, Pharmaexpert и/или молекулярный докинг) для прогноза возможных биологических мишеней и возможностей связывания с ними БАС, выбора тест-ферментов для создания на их основе специфических ферментных биотест-систем; *in vitro* (СФБТС) для определения целевой биологической активности и *in vivo* (экспериментальные модели – лабораторные животные) для подтверждения приемлемости и целесообразности использования СФБТС для оценки БАС различного происхождения и агрегатного состояния.

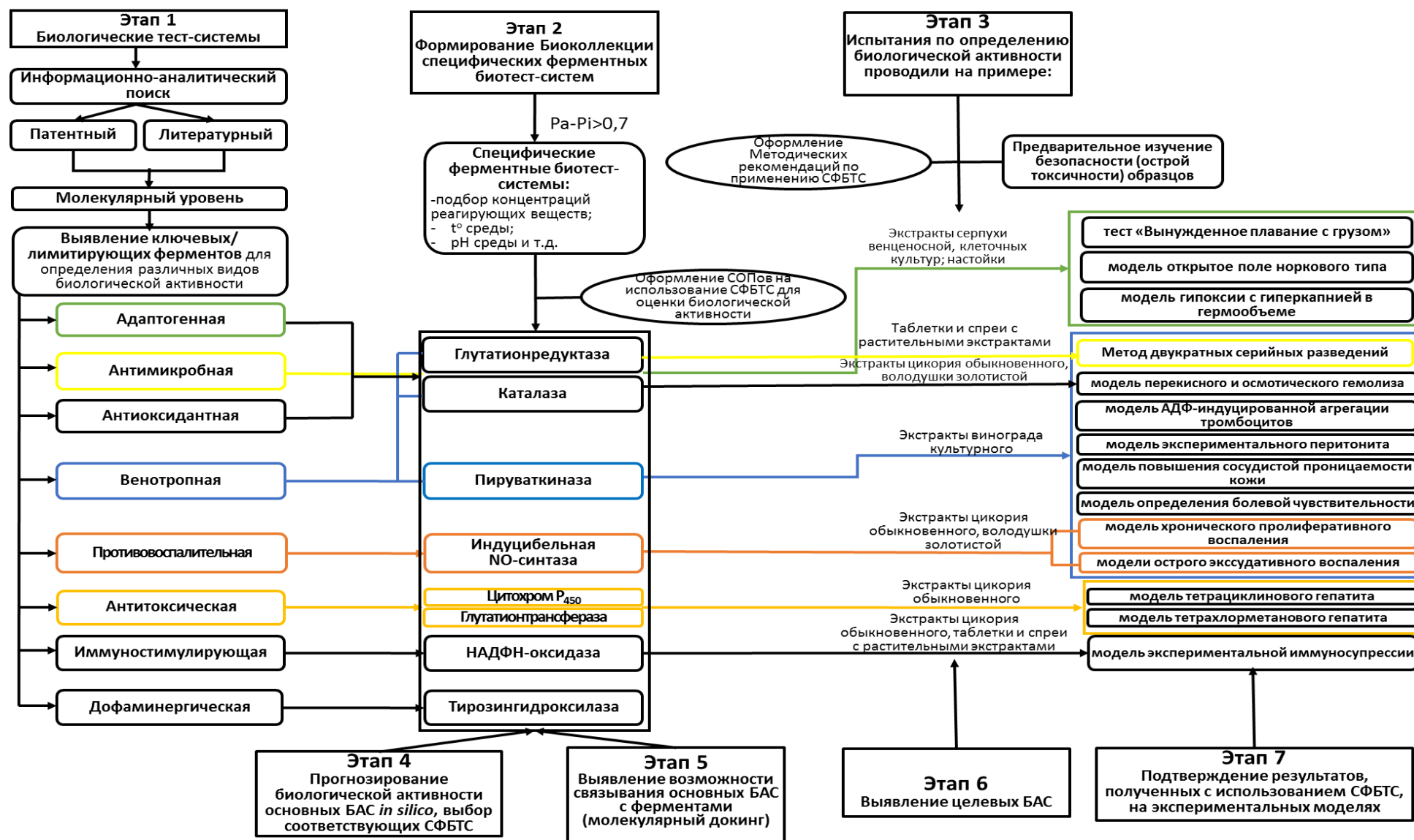
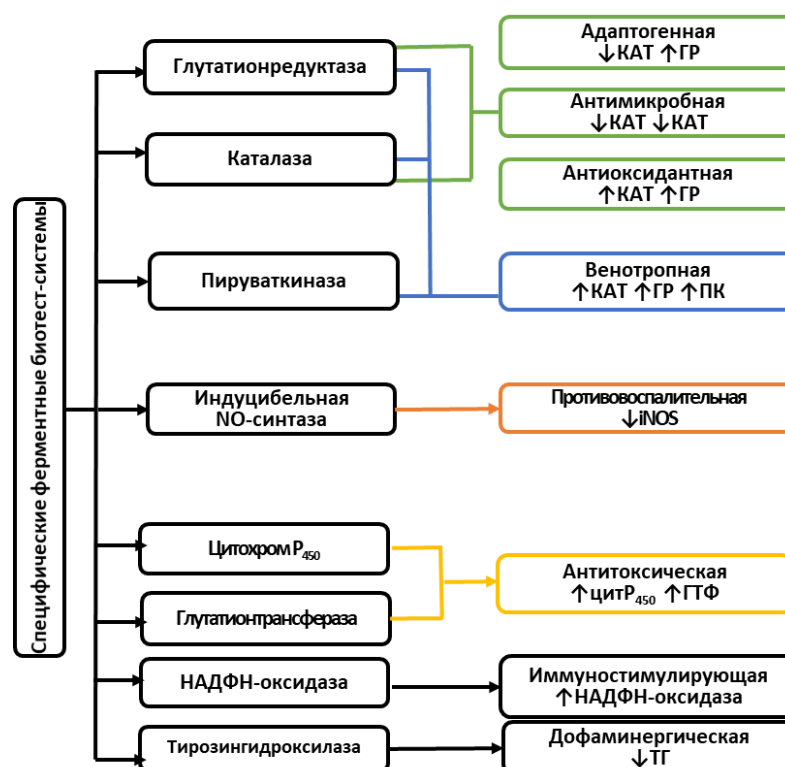


Рисунок 14 – Этапы исследования по созданию методологии формирования и применения СФБТС



При переходе от методов *in silico* к методам *in vitro* учитывали наиболее вероятную активность БАС для выбора тест-фермента, на основе которого формировались биотест-системы ( $P_a - P_i > 0,5$ ), каждая из которых коррелирует с определенным видом фармакологической активности и позволяет оценить исследуемый объект 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 (Рисунок 15).



**Рисунок 15** – Схема формирования первичных и вторичных СФБТС

Достоверность полученных результатов *in vitro* подтверждали на конкретных экспериментальных моделях (Рисунок 16) согласно Руководству по проведению доклинических исследований [86, 87].

### Выводы по главе 3

1. На основании информационно-аналитического поиска и прогнозируемой *in silico* биологической активности соединений отобраны и охарактеризованы клю-

чевые/лимитирующие ферменты гомеостаза в качестве молекулярных тест-объектов; на их основе сформированы первичные и, представляющие собой сочетание первичных – вторичные, специфические ферментные биотест-системы *in vitro* (в случае многофакторного патогенеза заболеваний) для оценки биологически активных соединений различного происхождения и агрегатного состояния.



**Рисунок 16** – Схема определения биологической активности растительных лекарственных средств на экспериментальных моделях *in vivo*

2. Сформированы и утверждены директором ФГБНУ ВИЛАР Реестр Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro*, который состоит из 5 первичных и 5 вторичных СФБТС (Приложение Б) и Положение о них (Приложение А), а также разработана и утверждена нормативная документация, касающаяся порядка использования, хранения и пополнения Биологической коллекции (Приложения В–Ж).

3. По результатам проведенных исследований отработаны этапы диссертационного исследования и предложена методология как формирования, так и применения специфических ферментных биотест-систем *in vitro*.

## **Глава 4. ИСПЫТАНИЕ ВТОРИЧНОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФЕРМЕНТНОЙ БИОТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ АДАПТОГЕННЫХ СВОЙСТВ НА ПРИМЕРЕ КУЛЬТУР КЛЕТОК ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Для проведения испытаний по приемлемости и применения СФБТС для оценки БАС были выбраны БАС различного происхождения и агрегатного состояния:

- сухие экстракты, полученные из нативного и биотехнологического сырья;
- жидкие лекарственные формы (настойки, спреи);
- твердые лекарственные формы (таблетки, таблетки для рассасывания), разработанные в ФГБНУ ВИЛАР, так как они наиболее показательны, информативны, изучены с использованием различных методов анализа и перспективны для получения на их основе субстанций медицинского, ветеринарного и пищевого назначения.

### **4.1 Изучение безопасности биологически активных соединений**

При оценке БАС обязательным является изучение их эффективности и безопасности [12], поэтому изучали параметры острой токсичности образцов выбранных субстанций. Определение острой токсичности проводили по методу Кербера [86]. Показано, что введение исследуемых субстанций мышам в диапазоне доз 50–1000 мг/кг не приводило к их гибели на протяжении всего периода наблюдения (14 дней), не было клинических признаков интоксикации; образцы относятся к малотоксичным веществам, в соответствии с классификацией токсичности химических веществ по ГОСТу 32644-2014.

### **4.2 Вторичная СФБТС для оценки биологически активных соединений из биотехнологического сырья**

Многим сильнодействующим растительным БАС, таким, как паклитаксел, подофиллотоксин или винбластин, сложно соответствовать требованиям рынка, так как их природные ресурсы – медленно растущие или даже исчезающие виды, которые накапливают целевые соединения в очень малых количествах за долгий период [237; 295]. Природные популяции многих лекарственных растений все чаще испытывают давление антропогенных факторов, таких как нарушение среды обитания, вырубка лесов и индустриализация из-за резкого роста населения, пожары и

другие стихийные бедствия, сельскохозяйственное освоение земель, изменения климата и др. Фактически, более 20 % мировых видов лекарственных и ароматических растений в разной степени находятся под угрозой [285]. Две трети из примерно 50 000 видов известных и используемых лекарственных растений собирают в дикой природе. Это вызывает следующие проблемы: сокращение популяций, утрата генетического разнообразия, исчезновение или деградация местообитаний [128]. Выделение БАС непосредственно из растений, приемлемо, если требуются небольшое их количество, например, для проведения небольших экспериментальных лабораторных работ. Рассматривать дополнительные пути пополнения запасов следует, если появится повышенный рыночный спрос на соответствующие БАС. Тогда запасы растительного сырья могут быть восполнены за счет применения культур растительных клеток и тканей [122]. Методами культивирования *in vitro* органов растений (обычно корней) можно обеспечить получение растительного сырья как источника БАС [293], однако биотехнологическое сырьё часто отличается по химическому составу от нативного растения. Поэтому объектами исследования являлись также *экстракты из биотехнологического сырья*.

СФБТС были апробированы на клеточных штаммах лекарственных растений (женьшень обыкновенного, линия Pa.g(S)14ВИЛАР и родиолы розовой, штамм Rr(S)2013ВИЛАР).

Корни женьшеня применяются в традиционной китайской медицине более 5000 лет для увеличения жизненных сил и улучшения общего состояния организма [223]. Третичный реликт, единственный на территории России представитель рода; вид, находящийся под угрозой исчезновения; за пределами России растет в Северо-Восточном Китае и на полуострове Корея, где встречается в естественном состоянии либо в культуре [3].

В подземной части (корнях) содержатся тритерпеноиды (до 12,7 %): (20R)-гинзенозид Rg3, (20R)-гинзенозид Rh2, (20R)-гинзенозид Rs3, (20R)-протопанаксадиол, (20S)-гинзенозид Rg3, (20S)-гинзенозид Rh2, (20S)-гинзенозид Rs3, (20S)-протопанаксадиол, 20-глюкогинзенозид-Rf (до 0,008 %), 3 $\beta$ -ацетоксипанаксадиол, 3 $\beta$ -октадеcanoат панаксадиола, 3 $\beta$ -пальмитат панаксадиола, гинзенозиды

F11, F4, Fn, Ia, Ki, Km, Ra, Ra1 (до 0,03 %), Ra2 (до 0,02 %), Ra3 (до 0,05 %), Rb1 (RB, FC1) (до 5,2 %), Rb2 (RC2, Lb2) (до 2,3 %), Rb3 (до 0,01 %), Rc (RC1, LC1, FC2) (до 2,5 %), Rd (Ld) (до 0,9 %), RD2, Re (RD1, Le, FD1) (до 2,1 %), RE1, RE3, Rf (до 0,76 %), Rf1, Rf2, Rfp, Rg, Rg1 (Lg1, RE2) (до 2,7 %), Rg2 (RE1, Lg2, FE1) (до 0,1 %), Rg3, Rg5, Rg6, Rg7, Rh, Rh1 (до 0,39 %), Rh2, Rh4, Rh5, Rh6, Rh7, Rh8, Rh9, Rk1, Rk2, Rk3, Ro (RA) (до 0,6 %), Rs1 (до 0,08 %), Rs2 (до 0,01 %), Rs3, Rs4, Rs5, Rz1, квинквенозид-R1 (до 0,015 %), кориогинзенозид R1 и R2, нотогинзенозид-R1 (до 0,007 %) и R4 (до 0,002 %), панаксадиол, панаксатриол, панаксатриол, панаксокиды В, С, D, E, F, тритерпеноиды GF-YI, GF-YII, MG-Rb1, MG-Rb2, MG-Rc, MG-Rd; стероиды (до 0,03 %): даукостерин, кампестерин, ситостерин, стигмастерин; углеводы (D-глюкоза (до 1 %), D-фруктоза (до 0,5 %), галактоза, декстроза, крахмал, мальтоза, маннит, пектин, сахароза (до 8,5 %)); органические кислоты (малеиновая, фумаровая, янтарная); азотсодержащие соединения (глутамин, аргинин,  $\alpha$ -пирролидон, холин (до 0,2 %),  $\beta$ -N-оксало-L- $\alpha,\beta$ -диаминопропионовая кислота, панаксаны F, G, H, I, J, K, L); фенолкарбоновые кислоты (салициловая, ванилиновая, *p*-гидроксикоричная (*p*-кумаровая), феруловая, сиреневая); гетероциклические кислородсодержащие соединения (мальтол); эфирное масло (до 0,5 %), в его составе: 1,3,5-триизопропилбензол,  $\alpha$ -гвайен,  $\alpha$ -элемен,  $\beta$ -элемен, гинзинен, панагинзен, панаксен, панацен; полиацетиленовые соединения (фалькаринол, фалькаринтриол, панаксидол, 10-ацетилпанакстриол, гептадецен-1-диин-4,6-диол-3,9, 10-ацетилпанакситриол, гептадекатриен-1,7,9-ин-4-ол-3, гептадецен-1-диин-4,6-триол-3,9,10, гептадекадиен-1,9-диин-4,6-ол-3, 9,10-эпоксигептадецен-1-диин-4,6-ол-3), полиацетилены А-1, А-2, А-3, В-1); лигнаны (гомизины А и N); витамины (В1, В2, В12, биотин, никотиновая, фолиевая, пантотеновая кислоты); жирное масло (до 0,45 %), в его составе кислоты: миристиновая, линолевая (до 42,6 %), пальмитоолеиновая (до 15,7 %), пальмитиновая (до 29,8 %), стеариновая (до 7,9 %), олеиновая (до 12,3 %), линоленовая (до 7,3 %) [323, 330, 331].

Известно, что БАС женьшеня обладают анальгетической, противоопухолевой, кардиопротекторной, антимикробной, нейропротекторной, гепатопротективной, антиоксидантной и др. активностью [137].

Культивирование женьшеня очень сложно и трудоемко, запасы данного вида сырья невелики [322]. В связи с этим широко разрабатывается получение продуктов метаболизма женьшеня обыкновенного из клеточных культур растений. В ФГБНУ ВИЛАР получен клеточный штамм женьшеня обыкновенного с высокими ростовыми и биосинтетическими характеристиками [10]. Определение целесообразности проведения с данным штаммом дальнейших исследований достаточно актуально. Поэтому оценка биологической активности метаболитов этой клеточной культуры может являться ключевым показателем перспективности проводимых исследований.

Сравнительный анализ биомассы женьшеня и нативного сырья (корня) показал их идентичность по химическому составу: в биомассе выявлены гинзенозиды: Rg1, Re, Rf, Rh1, Rg2, Rb1, Rb2, Ro, Rb3, Rd, F2, Rh3, малонил-Rg1, Rb1, Rd, нотогинзенозид R1, R2, K, R6, таншинон ПА, криптотаншинон 1, 2 и др. [5].

#### Родиолы розовой корни и корневища

Родиола розовая, известная также как «золотой корень», произрастает на Урале, на севере Европейской части России, в арктических и горных районах Западной и Восточной Сибири и на Дальнем Востоке. Вне России вид распространен в арктических районах Европы, Скандинавии, Средней Азии, Монголии, Китая и Северной Америки [3].

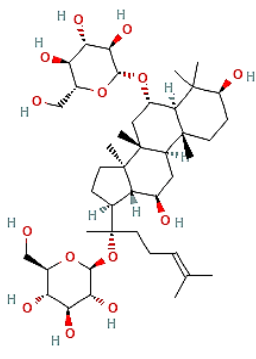
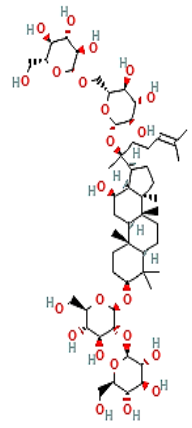
В подземной части (корни и корневища) содержатся фенилпропаноиды (гликозиды коричневого спират: розин, розавин и розарин) фенольный спирт тирозол и его гликозид салидрозид; монотерпеновые спирты; цианогенные гликозиды; арилгликозиды; флавоноиды (трицин и его гликозиды; флавонол-гликозиды (астрагалин, кемпферол); проантоцианидины и производные галловой кислоты; дубильные вещества (до 20 %); антрахинон; эфирное масло, в составе которого идентифицированы гераниол, линалоол, терпинеол, 2-фенилэтилацетат, карен, мирцен, миртенол, кумол и цитраль [121; 234; 263; 268].

БАС корней и корневищ родиолы розовой обладают противодиабетическим, противоопухолевым, антивозрастным и нейропротекторным действием [234].

В отделе биотехнологии ФГБНУ ВИЛАР получен клеточный штамм родиолы розовой с высокими ростовыми и биосинтетическими характеристиками. В связи с чем оценка биологической активности БАС из экстракта данной клеточной культуры является актуальной задачей. В клеточной культуре родиолы розовой отсутствуют салидрозид и розевин, при этом присутствует значительное количество фенолпропаноидов, производные кумарового спирта, кумаровой и кофейной кислот (розин, гидроксирозин), лигнаны и ситостерины [88].

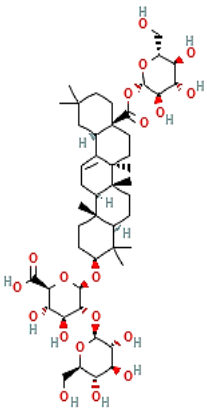
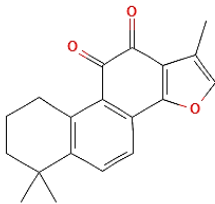
Биологическая активность основных БАС субстанций была спрогнозирована по Программе PASS. Результаты представлены в Таблице 14.

**Таблица 14** – Наивысшие значения оценок Pa-Pi, полученные для преобладающих в сухом экстракте из суспензионной культуры женьшеня обыкновенного БАС

|                | <i>Соединение</i>   | <i>Вид активности</i>   | <i>Значение Pa-Pi</i>                     |
|----------------|---|---|---|
| Гинзенозид Rg1 |   | При деменции<br>Гепатопротективная<br>Иммуностимулирующая<br>Антиоксидантная<br>Противовоспалительная | 0,973<br>0,952<br>0,887<br>0,808<br>0,771 |
| Гинзенозид Rb1 |  | Гепатопротективная<br>При деменции<br>Иммуностимулирующая<br>Антиоксидантная<br>Противовоспалительная | 0,976<br>0,942<br>0,926<br>0,841<br>0,763 |

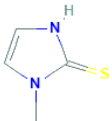


## Продолжение таблицы 14

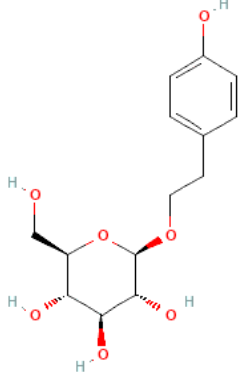
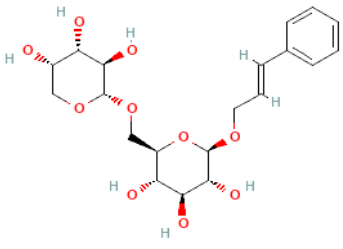
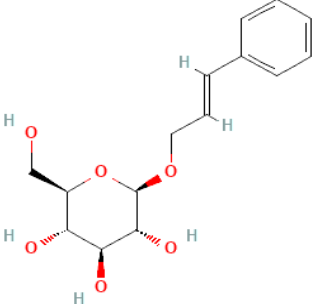
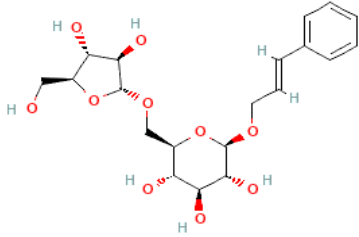
| <i>Соединение</i> |  | <i>Вид активности</i>  | <i>Значение Pa-Pi</i>            |
|-------------------|--|--|----------------------------------|
| Гинзенозид Ro     |   | Гепатопротективная<br>Иммуностимулирующая<br>Антитоксическая<br>При деменции     | 0,990<br>0,822<br>0,814<br>0,767 |
| Танхинон ПА       |  | Агонист апоптоза<br>Ингибитор фосфатазы<br>Стимулятор цитохрома P <sub>450</sub> | 0,675<br>0,502<br>0,498          |

Основными биологически активными веществами родиолы розовой являются тирозол, салидрозид, розавин, розин и розарин [88]. Прогноз их биологической активности с помощью Программы PASS представлен в Таблице 15.

**Таблица 15** – Наивысшие значения оценок Pa-Pi, полученные для преобладающих в сухом экстракте из суспензионной культуры родиолы розовой БАС

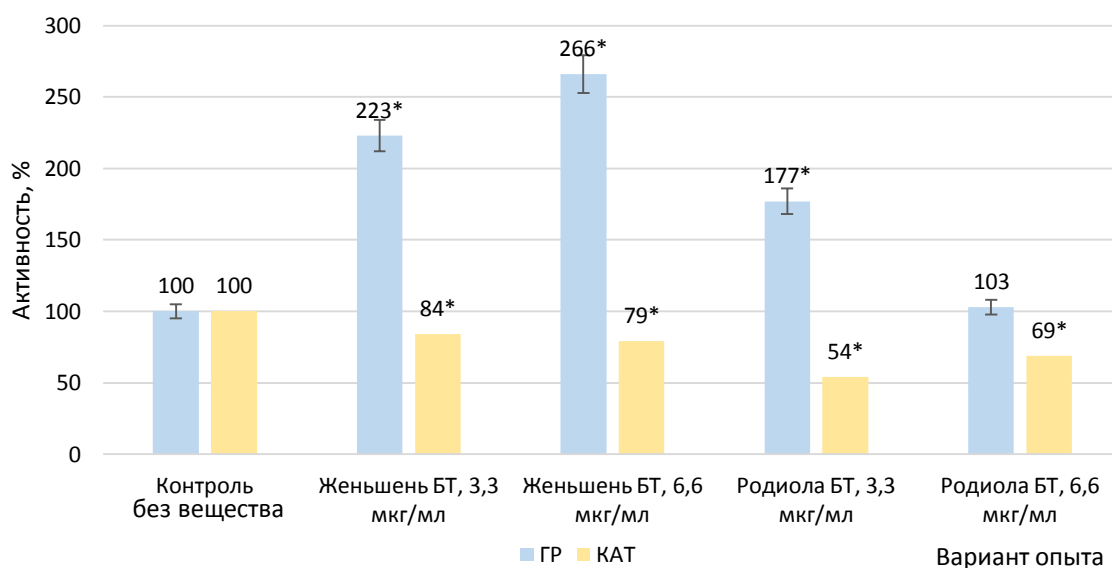
| <i>Соединение</i> |   | <i>Вид активности</i>  | <i>Значение Pa-Pi</i>                     |
|-------------------|---|--|---|
| Тирозол           |  | При фобических расстройствах<br>Антиоксидантная<br>Антигипоксическая<br>Антиоксидантная<br>Противовоспалительная | 0,774<br>0,638<br>0,579<br>0,808<br>0,771 |

Продолжение таблицы 15

|            | <i>Соединение</i>   | <i>Вид активности</i>  | <i>Значение Pa-Pi</i>            |
|------------|---|--|----------------------------------|
| Салидрозид |    | Ингибитор проницаемости мембран<br>Ингибитор фосфатазы                                       | 0,752<br>0,616                   |
| Розавин    |   | Гепатопротективная<br>Антигипоксическая<br>Противовоспалительная<br>Иммуностимулирующая      | 0,744<br>0,717<br>0,680<br>0,672 |
| Розин      |  | Вазопротекторная<br>Антигипоксическая<br>Гепатопротекторная<br>«Ловушка свободных радикалов» | 0,938<br>0,857<br>0,809<br>0,717 |
| Розарин    |  | Вазопротекторная<br>Антигипоксическая<br>Гепатопротекторная<br>«Ловушка свободных радикалов» | 0,953<br>0,888<br>0,854<br>0,764 |

Все указанные виды биологической активности характерны для БАС, повышающих неспецифическую сопротивляемость организма к негативным воздействиям окружающей среды.

Для выявления спрогнозированной *in silico* адаптогенной активности экстрактов из клеточных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой применяли СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы. Результаты представлены на Рисунке 17.



*Примечание* – Далее и везде \* – достоверность различий с контролем,  $p < 0,05$ ; данные выражены в процентах от контроля

**Рисунок 17** – 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 (Рисунок 16) видно, что оба экстракта из биотехнологического сырья проявляли адаптогенные свойства, ускоряя глутатионредуктазную реакцию и снижая скорость каталазной реакции. Более выраженное влияние на активность ферментов проявил экстракт суспензионной культуры женьшеня обыкновенного в дозе 6,6 мкг/мл и родиолы розовой в дозе 3,3 мкг/мл.

При проведении **молекулярного докинга** в активные сайты ГР и КАТ установлена наибольшая энергия связывания с ГР для гинзенозида Re (-9,6 ккал/моль) и таншинона ПА (-8,8 ккал/моль). Стоит отметить отсутствие возможного взаимодействия розарина с активным сайтом ГР, при этом энергия взаимодействия розина

с активным сайтом ГР составила  $-7,7$  ккал/моль. Энергия связывания ведущих БАС исследуемых экстрактов с активным сайтом КАТ находилась в пределах от  $-7,0$  ккал/моль для розарина, до  $-8,4$  ккал/моль для гинзенозида Re. Для гинзенозида Re установлена наибольшая энергия связывания с гемом в составе КАТ, а также с альтернативным сайтом связывания с ГР. Розарин показал высокую энергию взаимодействия с cys58. Среди не-цистеин-взаимодействующих соединений наилучшие результаты показаны для гинзенозидов Rg1 и Re.

Достоверность результатов, полученных с использованием СФБТС *in vitro*, подтверждали, сравнивая их с данными *in vivo* на экспериментальных моделях: стандартный тест гипоксической гипоксии с гиперкапнией в сравнении с 70%-м спиртовым экстрактом из корней женьшеня обыкновенного (ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия) и 40%-й спиртовой экстракт из корней и корневищ родиолы розовой (ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия).

Лабораторным животным (мыши) экстракты вводили внутривенно в дозе, соответствующей терапевтической, указанной в «Инструкции по медицинскому применению», (согласно коэффициенту пересчета доз, для лабораторных мышей) 2,0 мл/кг.

На 4 день эксперимента через 30 мин после введения объектов исследования был проведен тест на исследование гипоксической активности в тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме. Мышей помещали в герметически закрывающиеся банки вместимостью 0,5 л по 4 штуки одновременно. Фиксировали длительность жизни каждого животного в банке от момента герметизации банки до последнего заметного дыхательного движения (независимо от предшествующих терминальных судорог), вычисляли среднее время выживания животных в гермообъеме. Результаты проведенных исследований представлены в Таблице 16.

В результате проведенного исследования установлено, что экспериментальный и фармакопейный экстракты женьшеня обыкновенного увеличивали среднее время выживания животных в гермообъеме на 27 % и 24 % соответственно по сравнению с контролем, что свидетельствует об антигипоксической активности данных экстрактов. Экспериментальный и фармакопейный экстракты родиолы розовой

увеличивали среднее время выживания животных в гермообъеме на 36 % и 34 % соответственно по сравнению с контролем, что также свидетельствует об антигипоксической активности изучаемых экстрактов.

**Таблица 16** – Результаты влияния экспериментальных экстрактов клеточных штаммов из женьшеня обыкновенного и родиолы розовой на время выживания мышей в гермообъеме

| <i>Группы животных, n = 10</i>  | <i>Время выживания, с</i> |
|---|---------------------------|
| Контроль  | 630±11,7                  |
| Экспериментальный экстракт суспензионной культуры женьшеня обыкновенного    | 800±7,5*                  |
| Фармакопейный 70%-й спиртовой экстракт из корней женьшеня обыкновенного     | 781±12,4*                 |
| Экспериментальный экстракт из культуры клеток родиолы розовой               | 856±5,5*                  |
| Фармакопейный 40%-й спиртовой экстракт из корней и корневищ родиолы розовой | 844±13,0*                 |

Результаты изучения влияния объектов исследования на физическую работоспособность и выносливость, представлены в Таблице 17.

**Таблица 17** – Результаты изучения работоспособности и выносливости мышей в тесте «Вынужденное плавание с грузом»

| <i>Группы животных, n = 10</i>  | <i>Длительность плавания, с</i> |                    |
|---|---------------------------------|--------------------|
|   | <i>I плавание</i>               | <i>II плавание</i> |
| Контроль  | 265,0±26,5                      | 318,0±27,6         |
| Экспериментальный экстракт из суспензионной культуры женьшеня обыкновенного | 331,3± 8,9*                     | 394,4±13,3*        |
| Фармакопейный 70%-й спиртовой экстракт из корней женьшеня обыкновенного     | 312,2±10,5*                     | 366,7±10,9*        |
| Экспериментальный экстракт из суспензионной культуры родиолы розовой        | 325,8±9,2*                      | 430,5±11,5*        |
| Фармакопейный 40%-й спиртовой экстракт из корней и корневищ родиолы розовой | 316,4±12,6*                     | 390,0±22,3         |

Как видно из данных, представленных в Таблице 17, экспериментальный и фармакопейный экстракты женьшеня обыкновенного и родиолы розовой не оказывали достоверного негативного влияния на изучаемые показатели в тесте «вынужденное плавание с грузом», что свидетельствует об отсутствии у них миорелакси-

рующего действия. Экспериментальный экстракт суспензионной культуры женьшеня обыкновенного достоверно увеличивал работоспособность на 25 %, а выносливость животных на 23 % по сравнению с контролем. В то время как фармакопейный экстракт увеличивал работоспособность на 17 %, а выносливость животных на 15 % по сравнению с контролем. Экспериментальный экстракт суспензионной культуры родиолы розовой достоверно увеличивал работоспособность на 23 %, а выносливость животных на 17 % по сравнению с контролем; фармакопейный экстракт увеличивал работоспособность на 35 %, а выносливость животных на 22 % по сравнению с контролем.

Таким образом, установлено, что экспериментальные образцы суспензионных культур родиолы розовой и женьшеня обыкновенного оказывали положительное влияние на физическую работоспособность и выносливость лабораторных животных.

Изучение основных параметров поведения и неврологического статуса лабораторных животных в условиях кратковременного психоэмоционального стресса с применением установки «открытое поле норкового типа» показало, что изучаемые экстракты из суспензионных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой не оказывали отрицательного влияния на нервную систему и поведение опытных животных.

Безусловно, адаптогенное действие выбранных объектов исследования обусловлено активностью их комплекса БАС. Так, основными действующими веществами экстракта корней и корневищ женьшеня обыкновенного являются гинзенозиды, при этом качественный состав БАС экстракта из суспензионной клеточной культуры женьшеня, полученного в ФГБНУ ВИЛАР схож с БАС нативного растения.

В экстракте из суспензионной клеточной культуры родиолы розовой отсутствуют салидрозид и розевин, которые по литературным повышают неспецифическую сопротивляемость организма к негативным факторам окружающей среды [234]. Однако, из полученных нами данных (Рисунок 15, Таблицы 16, 17) видно, что изучаемый экстракт обладал адаптогенной активностью, сравнимой с активностью экстракта из нативного сырья. Это может быть связано с тем, что в экстракте

из суспензионной клеточной культуры было обнаружено большое количество фенолпропаноидов, которые, как известно, являются перспективным источником БАС адаптогенного действия [45].

Неспецифическая резистентность, развивающаяся при адаптации к условиям гипоксии, имеет большое значение в снижении воздействия на организм неблагоприятных факторов окружающей среды, профилактики и лечении некоторых заболеваний. В данной работе в стандартном тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией экстракты из суспензионных клеточных культур увеличивали среднее время выживания лабораторных животных, что согласуется с литературными данными. Так, например, Lagunin и соавт. в своей работе спрогнозировали с помощью Программы PASS (версия 2019) антигипоксические свойства культуры клеток *Panax japonicas* var. *repens* (T.Nees) C.A.Mey [212].

Полученные нами экспериментальные данные подтверждены результатами из литературных источников. В условиях опытов *in vitro*, *in vivo* и клинических исследованиях учеными доказаны безопасность препаратов из клеточных культур женьшеня обыкновенного и их антиоксидантная, противодиабетическая, антифибротическая, противовоспалительная, противоопухолевая и гепатопротекторная активность [242; 243].

Исследуемые авторами экстракты из суспензионной культуры родиолы розовой также доказали свою эффективность и обладали меньшим количеством побочных эффектов по сравнению с современными препаратами при лечении различных болезней; показана возможность использования БАС экстракта родиолы розовой, полученного из биотехнологического сырья в разработке лекарственных средств и биологически активных добавок, оказывающих адаптогенное, противоопухолевое, противомикробное, антиоксидантное действие [112].

Таким образом, увеличение времени выживаемости лабораторных животных в условиях теста гипоксической гипоксии с гиперкапнией; увеличение физической работоспособности и выносливости в тесте «вынужденное плавание с грузом», а также полученные данные о том, что экстракты из суспензионных культур женьшеня обыкновенного и родиолы розовой не оказывали отрицательного влияния на

нервную систему и поведение лабораторных животных на модели «открытое поле» норкового типа подтверждают установленные ранее *in vitro* результаты об их адаптогенной активности.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что клеточные культуры женьшеня обыкновенного и родиолы розовой являются перспективным биотехнологическим сырьем для разработки на их основе безопасных лекарственных средств, повышающих неспецифическую сопротивляемость организма к негативным воздействиям окружающей среды и стрессу.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения СФБТС для оценки БАС из биотехнологического сырья.

#### **Выводы по главе 4**

1. На основании проведенных исследований показано, что биологически активные соединения, на примере которых проводили испытания специфических ферментных биотест-систем, относятся к малотоксичным веществам.

2. На примере культур клеток женьшеня обыкновенного и родиолы розовой (штаммы ВИЛАР) показано, что обе субстанции ускоряли глутатионредуктазную реакцию и снижали скорость каталазной реакции *in vitro*, что коррелирует с наличием у них адаптогенной активности. Целесообразность и достоверность использования СФБТС для оценки БАС из биотехнологического сырья доказана при сравнительном изучении адаптогенной активности образцов и использованием органоизмененных биотест-систем: обе субстанции увеличивали среднее время выживания животных в гермообъеме (культуры клеток женьшеня обыкновенного на 27 %, родиолы розовой – на 36% по сравнению с контрольной группой животных); в тесте «Вынужденное плавание с грузом» показано, что оба образца оказывали достоверное положительное влияние на работоспособность и выносливость лабораторных животных. СФБТС показали свою эффективность и перспективность при оценке БАС, полученных из биотехнологического сырья.

3. Таким образом, результаты, полученные с СФБТС сопоставимы с данными на разрешенных биотест-системах организменного уровня.



## Глава 5. ИСПЫТАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОЦЕНКИ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

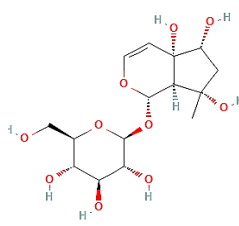
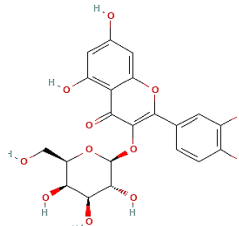
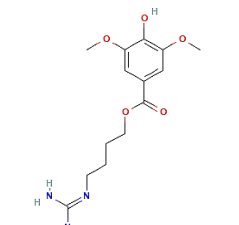
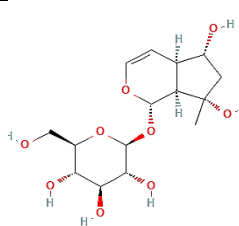
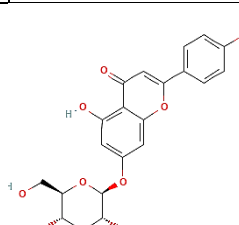
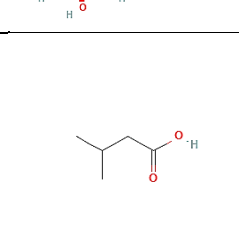
Одной из важных задач современной фармацевтической промышленности является совершенствование лекарственных форм, в том числе спиртосодержащих растительных компонентов, что расширяет не только ассортимент, но и области применения растительных комплексов БАС [58]. Разработка технологии получения настоек со сниженным содержанием спирта этилового позволила бы значительно расширить контингент пациентов, снизить затраты производителя, повысить приоритет настоек по отношению к другим лекарственным формам. Однако важным является вопрос сохранения в таких настойках их терапевтического эффекта, по сравнению с фармакопейными настойками [282; 92]. При разработке инновационных лекарственных форм одним из важных этапов является подтверждение сохранения заданной фармакологической активности, что может быть осуществлено с помощью специфических ферментных биотест-систем *in vitro* в рамках комплексного контроля качества растительных лекарственных средств. В связи с чем объектами исследования являлись *настойки, твердые и жидкие лекарственные формы из растительного сырья*.

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

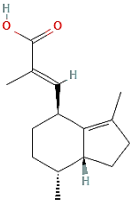
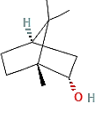
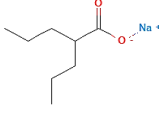
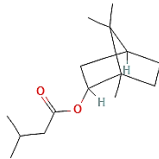
В работе использованы экспериментальные спиртосодержащие настойки валерианы лекарственной (*Valeriana officinalis* L. s. l.) и пустырника сердечного (*Leonurus cardiaca* L.) из лекарственного растительного сырья, отличающиеся от выпускаемых фармацевтическими предприятиями пониженным содержанием экстрагента [84].

Активность целевых БАС в настойках проанализировали с помощью программы PASS (Таблица 18) в виде упорядоченного списка названий биологической активности каждого соединения и значений  $P_a-P_i$ . Упорядочивание списка выполнено по убыванию значений  $P_a-P_i$ , соответственно, более вероятные виды активности находятся в начале [91; 198].

**Таблица 18** – Наивысшие значения оценок Pa-Pi, полученные для преобладающих в настойках календулы, валерианы и пустырника БАС

| Объект исследования | Соединение  | Вид активности                | Значение Pa-Pi |
|---------------------|---|-------------------------------|----------------|
| Настойка пустырника | <br>Гарпагид                 | Противовоспалительная         | 0,929          |
|                     |   | Гепатопротективная            | 0,795          |
|                     | <br>Гиперозид                | При деменции                  | 0,728          |
|                     |   | Антиоксидантная               | 0,665          |
|                     | <br>Леонуриин               | Антимикробная                 | 0,635          |
|                     |   |                               |                |
|                     | <br>Аюгол                  | Кардиопротекторная            | 0,983          |
|                     |   | Гепатопротективная            | 0,960          |
|                     |   | Антиоксидантная               | 0,910          |
|                     |   | Антидот                       | 0,785          |
|                     | <br>Космосин               | Антимикробная                 | 0,590          |
|                     |   |                               |                |
|                     |   | При различных фобиях          | 0,705          |
|                     |   | Радиопротекторная             | 0,433          |
|                     | <br>Изовалереновая кислота | Кардиопротекторная            | 0,412          |
|                     |   |                               |                |
|                     |   | Гепатопротективная            | 0,907          |
|                     |   | Противовоспалительная         | 0,885          |
|                     |   | Аналептическая                | 0,835          |
|                     |   | Антиоксидантная               | 0,725          |
|                     |   | При деменции                  | 0,717          |
|                     |   | Антимикробный                 | 0,651          |
|                     |   | Кардиопротекторная            | 0,894          |
|                     |   | Антиоксидантная               | 0,852          |
|                     |   | Антимикробная                 | 0,586          |
|                     |   |                               |                |
| Настойка валерианы  |   | При разных формах фобии       | 0,972          |
|                     |   | Антагонист нейротрансмиттеров | 0,628          |

## Продолжение таблицы 18

| Объект исследования | Соединение   | Вид активности   | Значение $P_a-P_i$      |
|---------------------|--|--|-------------------------|
| Настойка валерианы  | Валереновая кислота<br>   | При различных фобиях<br>Противовоспалительная<br>Ингибитор фосфатазы | 0,647<br>0,613<br>0,608 |
|                     | Борнеол<br>               | Аналептическая<br>При деменции                                       | 0,851<br>0,673          |
|                     | Валерин<br>               | При различных фобиях<br>Анестезирующая                               | 0,596<br>0,486          |
|                     | Борнилизовалерианат<br> | Аналептическая<br>При различных фобиях<br>При деменции               | 0,897<br>0,806<br>0,519 |

Основываясь на полученных *in silico* данных, можно предположить, что настойки валерианы и пустырника будут обладать адаптогенной активностью и влиять на активность каталазы и глутатионредуктазы [129].

Биологическую активность экспериментальных готовых лекарственных форм оценивали с помощью вторичной СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы. Результаты представлены в Таблице 19.

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

**Таблица 19** – Результаты оценки ЭЛФ с использованием вторичной СФБТС на основе КАТ и ГР, выраженную в процентах от контроля

| Вариант опыта                         | Скорость реакции, $M \pm m$        |      |                                    |     |
|---------------------------------------|------------------------------------|------|------------------------------------|-----|
|                                       | Каталазная                         |      | Глутатионредуктазная               |     |
|                                       | нмоль/(мин·мг белка) ( $M \pm m$ ) | %    | нмоль/(мин·мг белка) ( $M \pm m$ ) | %   |
| Контроль                              | 46,9±1,93                          | 100  | 2,92±0,122                         | 100 |
| Настойка валерианы экспериментальная  | 45,1±1,73                          | 96,1 | 3,71±0,147*                        | 127 |
| Настойка валерианы фармакопейная      | 42,7±1,18*                         | 91,2 | 3,65±0,176*                        | 125 |
| Настойка пустырника экспериментальная | 65,7±2,76*                         | 83,0 | 4,15±0,173*                        | 142 |
| Настойка пустырника фармакопейная     | 37,3±1,59*                         | 79,5 | 4,03±0,167*                        | 138 |

Также проводили оценку биологической активности ЭЛФ в сравнении с фармакопейными настойками с использованием тест-систем организменного уровня в стандартных тестах гипоксической гипоксии с гиперкапнией и хлоралгидратного сна (Таблица 20).

**Таблица 20** – Результаты влияния экспериментальных настоек на время выживания мышей в гермообъеме

| Группы животных, n = 10           | Время выживания мышей в гермообъеме (с) |
|-----------------------------------|---|
| Контроль                          | 620±29,8                                |
| Настойка валерианы                | 761±35,9*                               |
| Фармакопейная настойка валерьяны  | 770±13,4*                               |
| Настойка пустырника               | 771±35,4*                               |
| Фармакопейная настойка пустырника | 775±12,5*                               |

В результате проведенного исследования установлено, экспериментальная и фармакопейная настойки валерианы увеличивали среднее время выживания животных в гермообъеме на 23 % и 24 % соответственно по сравнению с контролем, что свидетельствует об антигипоксической активности данных настоек. Экспериментальная и фармакопейная настойки пустырника увеличивали среднее время выживания животных в гермообъеме на 24 % и 25 % соответственно по сравнению с контролем. 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.

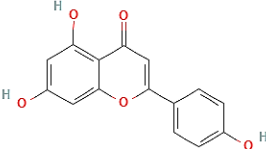
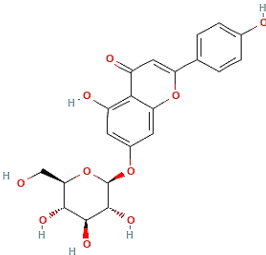
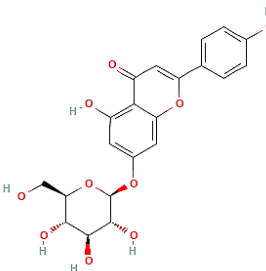
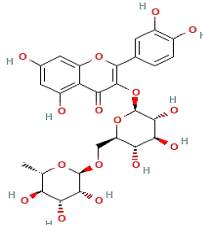
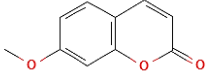
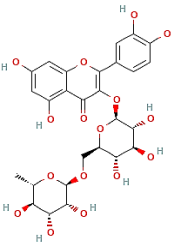
## **5.2. Испытания вторичной СФБТС для оценки эффективности таблеток с жидким растительным экстрактом в эксперименте**

Ротокан – противовоспалительное средство, для приготовления которого используют цветки ромашки аптечной (ромашки ободранной) – *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (*Matricaria recutita* L., *M. Chamomilla* L.) – семейства Астровые – *Asteraceae*, цветков ноготков лекарственных (календулы лекарственной) – *Calendula officinalis* L. семейства Астровые – *Asteraceae* и травы тысячелистника обыкновенного – *Achillea millefolium* L. семейства Астровые – *Asteraceae*. Лечебное действие «Ротокана» обусловлено наличием в нем целого комплекса биологически активных веществ: флавоноидов, терпеноидов, полиеновых соединений, полисахаридов, веществ основного характера и др. [15, 46]. На сегодняшний день Ротокан производится в виде водно-спиртового экстракта. К недостаткам такой лекарственной формы относится неудобство их использования, требующее определенных приемов в отвешивании, ограничения по приему при управлении транспортным средством и пр. В связи с этим, создание инновационных, удобных для применения лекарственных форм, а также подтверждение их фармакологической активности является актуальным.

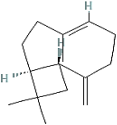
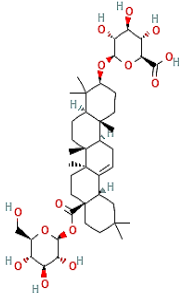
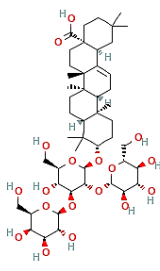
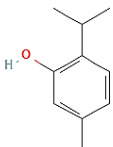
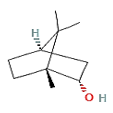
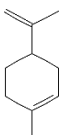
Для подтверждения специфической активности твердой лекарственной формы (таблетки для рассасывания) с экстрактом «Ротокан», провели изучение его биологических свойств с использованием СФБТС.

Изучали спрогнозированную активность для БАС, которые обуславливают основные свойства жидких экстрактов цветков ромашки, цветков календулы, травы тысячелистника, входящих в состав «Ротокана» [37] в Программе PASS (Таблица 21).

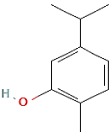
**Таблица 21** – Наивысшие значения оценок  $Ra-Pi$ , полученные для преобладающих в комплексном жидком экстракте «Ротокан» БАС

| Экстракт           | Целевые БАС   | Биологическая активность  | Значение $Ra-Pi$  |
|--------------------|---|---|---|
| Экстракт ромашки   | <p>Апигенин</p>                | <p>Антиоксидантная</p> <p>Противовоспалительная</p> <p>Антимикробная</p>  | <p>0,794</p> <p>0,660</p> <p>0,594</p>  |
|                    |   | <p>Космосин</p>    | <p>Противовоспалительная</p> <p>Противогрибковая</p> <p>Противомикробная</p> <p>Иммуностимулирующая</p> |
|                    | <p>Апигенин-7-О-глюкозид</p>  | <p>Антиоксидантная</p> <p>Ингибитор ксантиноксидазы</p> <p>Противогрибковая</p> <p>Противовоспалительная</p> <p>Противомикробная</p> <p>Иммуностимулирующая</p> | <p>0,852</p> <p>0,782</p> <p>0,756</p> <p>0,704</p> <p>0,586</p> <p>0,546</p>                           |
|                    | <p>Рутин</p>                 | <p>Антиоксидантная</p> <p>Противовоспалительная</p> <p>Противогрибковая</p> <p>Противомикробная</p> <p>Иммуностимулирующая</p>                                  | <p>0,910</p> <p>0,728</p> <p>0,705</p> <p>0,590</p> <p>0,570</p>  |
|                    | <p>Герниарин</p>             | <p>Ингибитор оксидоредуктаз</p> <p>Ингибитор киназ</p> <p>Противовоспалительная</p> <p>Антисептическая</p>  | <p>0,783</p> <p>0,699</p> <p>0,577</p> <p>0,500</p>   |
| Экстракт календулы | <p>Рутин</p>                 | <p>Ингибитор проницаемости мембран</p> <p>Антиоксидантная</p> <p>Противовоспалительная</p>  | <p>0,980</p> <p>0,734</p> <p>0,728</p>  |

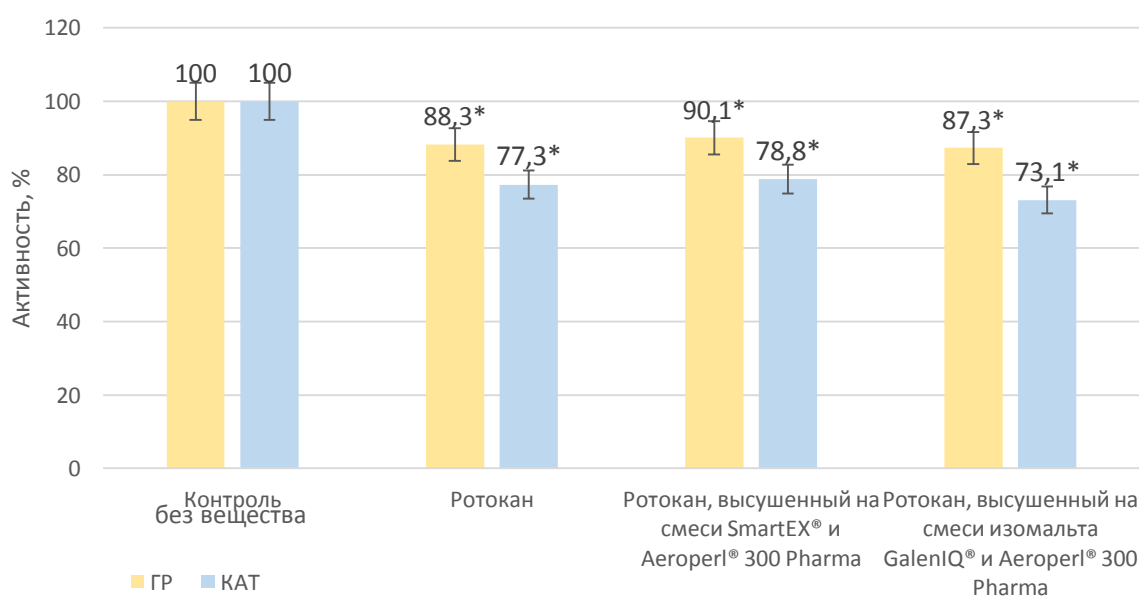
Продолжение таблицы 21

| Экстракт                | Целевые БАС    | Биологическая активность  | Значение $R_a-P_i$  |                                  |
|-------------------------|----------------|---|---|----------------------------------|
| Экстракт календулы      | Кариофиллен    |    | Противовоспалительная<br>При дерматологических патологиях<br>Ингибитор фосфатазы                                    | 0,734<br>0,728<br>0,698          |
|                         | Календулозид F |    | Ингибитор проницаемости мембран<br>Противовоспалительная<br>Ингибитор фосфатазы<br>При дерматологических патологиях | 0,926<br>0,831<br>0,606<br>0,593 |
|                         | Календулозид С |   |   |                                  |
| Экстракт тысячелистника | Тимол          |  | Антисептическая<br>Противоинфекционная<br>Ингибитор оксидоредуктаз  | 0,910<br>0,824<br>0,673          |
|                         | Борнеол        |  | Ингибитор оксидоредуктаз<br>Ингибитор фосфатазы   | 0,685<br>0,683                   |
|                         | Лимонен        |  | Противовоспалительная<br>Противогрибковая   | 0,581<br>0,562                   |

## Продолжение таблицы 21

| Экстракт                | Целевые БАС | Биологическая активность   | Значение $P_{\alpha-Pi}$         |
|-------------------------|-------------|--|----------------------------------|
| Экстракт тысячелистника | Карвакрол   | <br>Антисептическая<br>Противоинфекционная<br>Ингибитор оксидоредуктаз<br>Противовоспалительная | 0,820<br>0,779<br>0,738<br>0,655 |

Основываясь на полученных *in silico* данных (Таблица 21) у исходного многокомпонентного экстракта и нескольких вариантов разработанных таблеток на основе экстракта, спрогнозирована антимикробная активность, которую изучали *in vitro* с помощью вторичной СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы (Рисунок 16). Объектами исследования являлись: зарегистрированное лекарственное средство в качестве препарата сравнения, экстракт, высушенный на смеси сопроцессингового продукта на основе L-гидроксипропилцеллюлозы (SmartEX<sup>®</sup>, Германия) и гранулированного кремния диоксида коллоидного (Aeroperl<sup>®</sup> 300 Pharma, Германия) и экстракт, высушенный на смеси изомальта (GalenIQ<sup>®</sup>, Германия) и Aeroperl<sup>®</sup> 300 Pharma. Результаты оценки биологической активности ЭЛФ на основе многокомпонентного экстракта представлены на Рисунке 18.

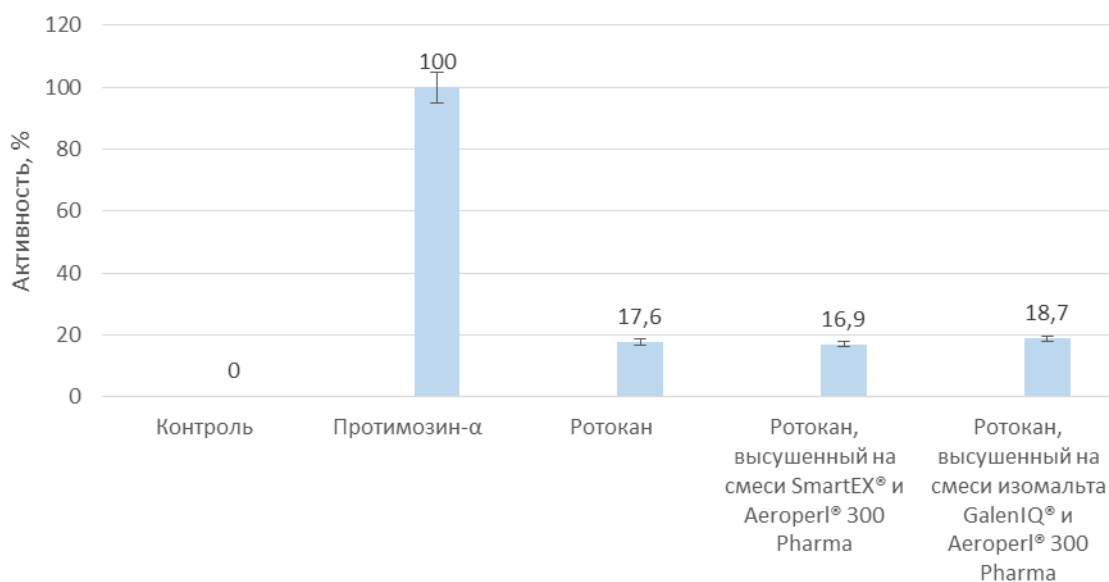


**Рисунок 18** – Результаты оценки жидкого комбинированного экстракта и таблеток на его основе с использованием вторичной СФБТС на основе КАТ и ГР



Как видно из представленных данных, все образцы ингибировали каталазу и глутатионредуктазу, проявляя антимикробную активность [66]. Наилучшие результаты показал образец экстракта, высушенный на смеси изомальта и гранулированного кремния диоксида коллоидного, который снижал скорость ГР-реакции на 12,7 %, а КАТ – на 26,9 %.

Так как «Ротокан» разрешен для медицинского применения в качестве улучшающего процессы регенерации средства в гастроэнтерологии и стоматологии [15] и, основываясь на данных Программы PASS, изучали иммуномодулирующую активность экстракта и ТЛФ на его основе с применением первичной СФБТС на основе НАДФН-оксидазы. Результаты представлены на Рисунке 19.



**Рисунок 19** – Результаты оценки жидкого комбинированного экстракта и таблеток на его основе с использованием первичной СФБТС на основе НАДФН-оксидазы

Как видно из Рисунка 18, в контрольной пробе, не содержащей БАС, скорость НАДФН-оксидазной реакции была равна 0. При добавлении в пробу, к гомогенату спокойных лейкоцитов, протимозина-α наблюдали активацию НАДФН-оксидазы: НАДФН окислялся со скоростью 44,21 нмоль/мин·10 мкл гомогената, что принимали за 100 %. При добавлении препарата сравнения в инкубационную среду скорость НАДФН-оксидазы увеличивалась на 17,6 % по отношению к контролю, что свидетельствует об его небольших иммуностимулирующих свойствах, сохраняющихся и в таблетках с данным экстрактом.

Для подтверждения целесообразности использования СФБТС для оценки эффективности ЭЛФ использовали метод двукратных серийных разведений: бактериостатической (питательная среда – МПБ) и фунгистатической (питательная среда – ЖСС). Биологический эффект определяли по минимальному, подавляющему рост бактерий и грибов, концентрации (разведению), при которой визуально не наблюдали роста микроорганизмов.

В качестве плацебо для экстракта использовали спирт этиловый 40 %, установлено, что он не влиял на активность экстракта. Плацебо для твердых лекарственных форм (таблетки, изготовленные только из вспомогательных веществ без активных компонентов) также не проявляли антимикробной активности в тех же условиях эксперимента. Результаты представлены в Таблице 21.

**Таблица 21** – Антимикробная активность комбинированного жидкого экстракта и таблеток на его основе

| Объекты 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>Microsporium canis</i> 352 |
|--|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---|------------------------------------|-------------------------------|
| Выпускаемый жидкий экстракт  | 1:160–1:200                        | 1:20                               | 1:20                              | 1:10                                    | 1:10                               | 1:80                          |
| Экстракт, высушенный на смеси SmartEX® и Aeroperl® 300 Pharma            | 1:80–1:160                         | 1:20                               | 1:20                              | 1:10                                    | 1:10                               | част. 1:80                    |
| Экстракт, высушенный на смеси изо-мальта GalenIQ® и Aeroperl® 300 Pharma | 1:80–1:160                         | 1:20                               | 1:20                              | 1:10                                    | 1:10                               | част. 1:80                    |

При изучении фунгистатического действия установлена наиболее высокая активность исходного жидкого экстракта (Таблица 21) в отношении мицелиального гриба *Microsporium canis* 352 – в разведении 1:80 и слабая фунгистатическая активность в отношении дрожжеподобного гриба *Candida albicans* ATCC 10231 в разведении 1:10.

Таким образом, методом двукратных серийных разведений показано, что экспериментальные лекарственные формы на основе многокомпонентного жидкого экстракта наиболее активны в отношении золотистого стафилококка

(*Staphylococcus aureus*), который относится к условно-патогенным микроорганизмам, который является возбудителем многих заболеваний, в том числе и воспалительных заболеваний полости рта [131], что подтверждает выявленные ранее с помощью СФБТС свойства – в таблетках сохраняется активность исходных компонентов многокомпонентного растительного экстракта.

### **5.3. Испытания вторичной СФБТС для оценки эффективности спрея и таблеток с растительными экстрактами в эксперименте**

Актуальной задачей современной фармацевтической промышленности является создание инновационных лекарственных средств растительного происхождения, которые способны комплексно влиять на различные звенья паталогического процесса и могут применяться длительное время различными возрастными группами пациентов, при этом сочетающие в одной лекарственной форме ингредиенты с различной фармакологической активностью [154]. Так, в ФГБНУ ВИЛАР был разработан комбинированный состав и технология получения лекарственных форм (таблетки, спреи) с растительными экстрактами антимикробного (Эвкалимин), противовоспалительного и иммуностимулирующего (Эстифан) действия для лечения воспалительных заболеваний полости рта [55].

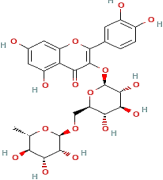
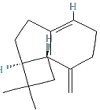
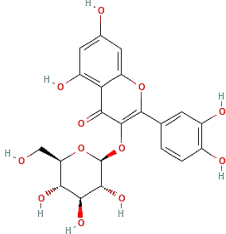
В листьях эвкалипта (*Eucalyptus viminalis* Labill.) содержится эфирное масло (0,4–1,1 %), в составе которого идентифицированы цинеол (до 65 %), пинен, фелландрена, альдегиды (4 %), эвдесмол (10 %), амиловый и другие спирты (11,34 %), аромадендрен; флавоноиды (кверцетин-3-β-D-глюкопиранозид, рутин); терпеноиды (лактон 11,12-дегидроурсоловой кислоты, маслиновая кислота, терпеноидные фенолоальдегиды флороглюцинового ряда): стерины (даукостерин) [3].

В надземной части (траве) эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L. Moench.) содержатся простые сахара, полисахариды, пектин, флавоноиды (рутин, кверцетин, кверцетин-7-галактозид, кверцетин-3-арабинозид, кверцетин-3-галактозид, кверцетин-3-ксилозид, кемпферол, кемпферол-3-рутинозид, никотифлорин (3-O-рутинозид кемпферола), изорамнетин, изорамнетин-3-рутинозид); антоцианы

и цианидин-3-О-(6-О-малонил-β-D-глюкопиранозид), дубильные вещества пиррокатехиновой группы (в листьях 7,2–10,2 %); фитомеланин; кумарины; фенолкарбоновые кислоты (цикориевая, кафтаровая, хлорогеновая, неохлорогеновая, кофейная, п-гидроксикоричная); белки (18,3-20 %); гликопротеины; сапонины; органические кислоты (3,3 %); эфирное масло (в траве 0,01–0,24 %, в листьях 0,01–0,64 %, в соцветиях 0,08–0,12 %), в составе которого идентифицированы борнеол, борнилацетат, пентадека-8-ен-2-он, гермакрен-Д, кариофиллен; ванилин; в масле свежих растений гермакреновый спирт; стерины (β-систотерин, систотерин-3-β-D-глюкозид, стигмастерин); смолистые вещества [3].

Экспериментальные лекарственные формы (спрей и таблетки) содержат растительные экстракты из эвкалипта прутовидного – «Эвкалимин» и эхинацеи пурпурной – «Эстифан». Прогноз биологической активности основных БАС по Программе PASS представлен в Таблице 22.

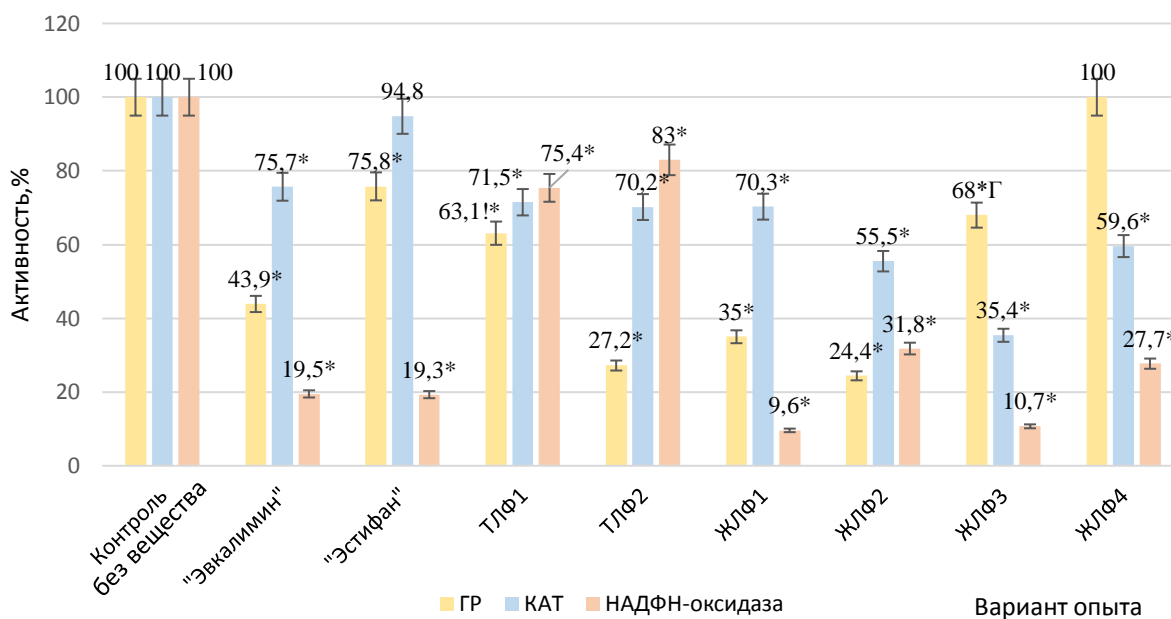
**Таблица 22** – Наивысшие значения оценок Pa-Pi, полученные для преобладающих в Эвкалимине и Эстифане БАС

| Объект исследования | Соединение  | Вид активности   | Значение Pa-Pi                                     |
|---------------------|---|--|--|
| Эвкалимин           | Рутин<br>                          | Ингибитор проницаемости мембран<br>Антиоксидантная<br>Противовоспалительная  | 0,980<br>0,734<br>0,728                            |
|                     | Кариофиллен<br>                    | Противовоспалительная<br>При дерматологических патологиях<br>Ингибитор фосфатазы   | 0,734<br>0,728<br>0,698                            |
|                     | Кверцетин-3-О-β-глюкопиранозид<br> | Ингибитор проницаемости мембран<br>Антиоксидантная<br>Противовоспалительная<br>Противοинфекционная<br>Противогрибковая<br>Противомикробная | 0,980<br>0,910<br>0,728<br>0,720<br>0,705<br>0,590 |

Продолжение таблицы 22

| Объект исследования | Соединение   | Вид активности  | Значение $P_a-P_i$                        |
|---------------------|--|---|---|
|                     | Маслиновая кислота<br>  | Ингибитор оксидоредуктаз<br>Противовоспалительная<br>Ингибитор фосфатазы<br>Противогрибковая<br>Иммуностимулирующая               | 0,882<br>0,875<br>0,719<br>0,590<br>0,714 |
|                     | Даукостерин<br>         | Ингибитор оксидоредуктазы<br>Иммуностимулирующая<br>Противогрибковая<br>Противовоспалительная                                     | 0,872<br>0,832<br>0,680<br>0,658          |
| Эстифан             | Цикориевая кислота<br> | Антисептическая<br>Антиоксидантная<br>Ингибитор фосфатазы<br>Противовоспалительная<br>Противоионфекционная                        | 0,786<br>0,742<br>0,582<br>0,577<br>0,552 |
|                     | Эхинацин<br>          | Стимулирует выработку макрофагов  | 0,838                                     |
|                     | Рутин<br>             | Ингибитор проницаемости мембран<br>Антиоксидантная<br>Противовоспалительная   | 0,980<br>0,734<br>0,728                   |
|                     | Кемпферол<br>         | Ингибитор проницаемости мембран<br>Ингибитор пероксидазы<br>Антиоксидантная<br>Ингибитор ксантиноксидазы<br>Противовоспалительная | 0,955<br>0,955<br>0,853<br>0,747<br>0,657 |

Таким образом, основываясь на данных *in silico* спрогнозировали иммуномодулирующую и антимикробную активность Эвкалимина и Эстифана, в связи с чем использовали сочетание СФБТС на основе КАТ и ГР и НАДФН-оксидазы (Рисунок 20).



**Рисунок 20** – Результаты оценки растительных экстрактов и ЭЛФ на их основе с использованием вторичной СФБТС на основе КАТ и ГР, и НАДФН-оксидазы

Как видно из Рисунка 20, в контрольной пробе, не содержащей БАС, скорость НАДФН-оксидазной реакции была равна 0. При добавлении в пробу, к гомогенату спокойных лейкоцитов, протимозина- $\alpha$  наблюдали активацию НАДФН-оксидазы: НАДФН окислялся со скоростью 69,8 нмоль/мин·10 мкл гомогената, что принимали за 100 %.

При добавлении субстанции Эвкалимина в пробу НАДФН окислялся со скоростью 20,3 нмоль/мин·10 мкл гомогената, что составляет 29 % от эффекта протимозина- $\alpha$ . Внесение субстанции Эстифана приводило к активации НАДФН-оксидазы реакции, скорость реакции составила 13,5 нмоль/мин·10 мкл гомогената, 19,3 % от эффекта протимозина- $\alpha$ .

Дозозависимый иммуномодулирующий эффект был выявлен у таблеток 300 мг и 700 мг. Так, оба образца таблеток с массой 300 мг и 700 мг увеличивали скорость НАДФН-оксидазной реакции на, в среднем, 80 % от эффекта препарата сравнения.

Из исследуемых жидких форм спрея максимальное иммуномодулирующее действие оказывала липосомальная форма. Данный препарат увеличивал скорость НАДФН-оксидазной реакции на 31,8 % при внесении эмульсии в систему от эффекта протимозина- $\alpha$ .

Определение скоростей ГР и КАТ реакций в присутствии таблеток разной массы показало, что таблетки 700 мг оказывали значительное влияние на активность реакций, катализируемых ферментами ГР и КАТ в условиях опыта *in vitro*. Так, ТЛФ (700 мг) снижал скорость КАТ-реакции на 29,8 %, а ГР – на 72,8 %, проявляя, таким образом, согласно [66] выраженные противомикробные свойства. Таблетки (300 мг) также снижали активность ГР- и КАТ-реакций, но в меньшей степени, проявляя противомикробные свойства.

Все четыре образца спрея оказывали ингибирующее действие на протекание ГР- и КАТ-реакций. Наибольшей противомикробной активностью обладала липосомальная форма спрея, который снижал скорость КАТ-реакции на 44,5 %, ГР-реакции – на 75,6 % в условиях опытов *in vitro*. Эвкалимин, известный антимикробный препарат, ингибировал протекание ГР-реакции примерно на 50 %, а КАТ – на 25 %. Эстифан, обладающий известными иммуномодулирующими свойствами, практически не оказывал влияния на активность реакций, катализируемых каталазой в условиях *in vitro*. В то же время, препарат достоверно снижал скорость ГР-реакции, проявляя умеренные антимикробные свойства.

Таким образом, в экстрактах и экспериментальных лекарственных формах выявлена *in vitro* антимикробная и иммуномодулирующая активность.

Ранее Бортниковой В. В. и соавт. в опытах *in vivo* был доказан иммуностимулирующий эффект «Эвкалимина», он увеличивал в 1,5–2 раза опсонофагоцитарный индекс [7], а также показан дозозависимый иммуностимулирующий эффект «Эстифана» в условиях опытов *in vivo* [8].

Приемлемость и достоверность использования СФБТС при оценке эффективности данных экспериментальных лекарственных форм подтверждали микробиологическими методами на патогенных бактериях методом двукратных серийных разведений препаратов в жидких питательных средах.

В качестве тест-микроорганизмов использовали патогенные грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* 209-P (ATCC 6538), грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, дрожжеподобные грибы *Candida albicans* ATCC 10231 и

мицелиальные грибы *Microsporium canis* 3/84. При изучении плацебо установлено, что все образцы не обладали антимикробной активностью и не влияют на активность объектов исследования.

В Таблице 23 представлены данные антимикробного действия таблеток и спрея, содержащих субстанции «Эвкалимин» и «Эстифан».

**Таблица 23** – Антимикробная активность таблеток и спрея, содержащих субстанции «Эвкалимин» и «Эстифан» (разведение/концентрация в мкг/мл)

| Объекты 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>Microsporium canis</i> 352 |
|-------------------------------------|--|------------------------------------|-----------------------------------|---|------------------------------------|-------------------------------|
|                                     | Разведение/концентрация<br>(в пересчете на Эвкалимин в мкг/мл) |                                    |                                   |   |                                    |                               |
| ЖЛФ 3 – Спрей (липосомальная форма) | 1:16   | 1:4                                | 1:8                               | 1:2                                     | 1:2                                | 1:4                           |
| ЖЛФ 4 – Спрей (липосомальная форма) | 1:64   | 1:8                                | 1:8                               | 1:4                                     | 1:4                                | 1:8                           |
| ЖЛФ 1 – Спрей (мицеллярная форма)   | 1:4/312  | 1:2/625                            | 1:2/625                           | 1:2/625                                 | 1:2/625                            | 1:2/625                       |
| ЖЛФ 2 – Спрей (мицеллярная форма)   | 1:2/625  | 1:2/625                            | 1:2/625                           | 1:2/625                                 | 1:2/625                            | 1:2/625                       |
| ТЛФ1 – таблетки 300 мг              | 31,2   | 1500                               | 1000                              | 1000                                    | 4000                               | 500                           |
| ТЛФ2 – таблетки 700 мг              | 15,6   | 1500                               | 1000                              | 1000                                    | 1000                               | 500                           |

Как видно из Таблицы 23, с применением стандартных микробиологических методов установлено наличие антимикробной активности объектов исследования в отношении всех изученных штаммов патогенных микроорганизмов. При этом наиболее высокая бактериостатическая активность выявлена у образца спрея (липосомальная форма) в отношении *Staphylococcus aureus* 209-P в разведении 1:64 и *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 в разведении 1:4-1:8, у этого же образца выявлено наибольшее фунгистатическое действие выявлено в отношении *Microsporium canis* 3/84 в разведении 1:8 (156 мкг/мл). При исследовании образцов таблеток 300 и 700 мг установлена их антимикробная активность в отношении всех изученных штаммов патогенных микроорганизмов, при этом у таблеток 700 мг выявлено наиболее выраженное бактериостатическое действие в отношении *Staphylococcus aureus* 209-P в концентрации 15,6 мкг/мл и фунгистатическое действие в отношении *Candida albicans* ATCC



10231 в концентрации 1000 мкг/мл и в отношении *Microsporium canis* 3/84 в концентрации 500 мкг/мл.

Таким образом, полученные данные о сохранении антимикробных и иммуномодулирующих свойств субстанций «Эвкалимина» и «Эстифана» в экспериментальных лекарственных формах (спреи и таблетки) подтвердили результаты, полученные с помощью специфических ферментных биотест-систем *in vitro*.

### **Выводы по главе 5**

1. СФБТС эффективны при оценке БАС различного агрегатного состояния не только на этапе скрининга, но и фармацевтической разработки, что было показано на примере экспериментальных спиртосодержащих настоек пустырника сердечного и валерианы лекарственной, отличающиеся от стандартных пониженным содержанием экстрагента. Согласно полученным с помощью СФБТС результатам, влияние, оказываемое экспериментальными настойками на активность ферментов, при снижении концентрации спирта этилового при их получении, сохраняется по сравнению с реализуемыми фармакопейными настойками. Полученные *in vitro* результаты согласуются с данными при использовании биотест-систем организменного уровня (стандартный тест гипоксической гипоксии с гиперкапнией и «хлоралгидратный сон»).

2. При фармацевтической разработке твердых лекарственных форм (таблетки для рассасывания) на основе выпускаемого жидкого комбинированного экстракта показана целесообразность применения СФБТС для подтверждения сохранения антимикробной активности исходного комплексного экстракта в разработанных на его основе таблетках.

3. Приемлемость применения СФБТС для оценки БАС различного агрегатного состояния продемонстрирована на примере экспериментальных лекарственных форм (жидкие – спреи и твердые – таблетки) на основе растительных субстанций «Эвкалимин» и «Эстифан». Результаты, полученные с помощью вторичной СФБТС на основе КАТ и ГР, а также НАДЛФН-оксидазы, показывают, что в ЭЛФ сохраняется биологическая активность исходных компонентов (антимикробная и

иммуномодулирующая), что дополнительно подтверждено исследованиями на патогенных бактериях.

## Глава 6. ИСПЫТАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОЦЕНКИ БАС ИЗ НАТИВНОГО СЫРЬЯ

Растительные объекты состоят из множества химических соединений [229], поэтому трудно оценить и идентифицировать активные компоненты, которые могут быть ответственны за их биологическую активность. Сложность состава растительных объектов и их многоцелевое и синергетическое действие во многих случаях затрудняют их исследования [276]. В связи с чем, испытания СФБТС по оценке БАС также проводили на примере *субстанций из дикорастущих и культивируемых растений различных семейств, обладающие разной биологической активностью*.

### 6.1. Испытание вторичной СФБТС для оценки венотропных свойств биологически активных соединений

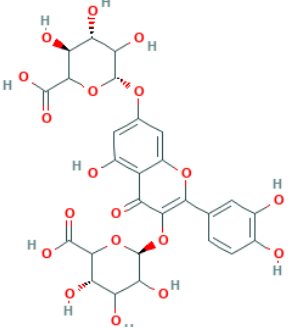
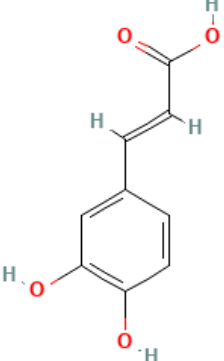
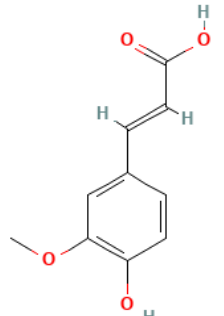
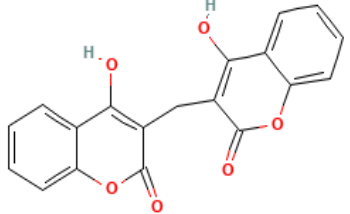
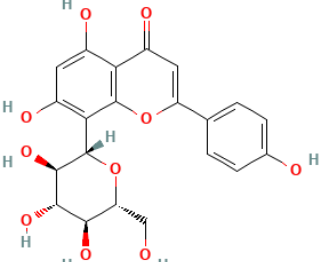
Для подтверждения целесообразности использования СФБТС при оценке венотропной активности БАС проведено исследование биологической активности сухих экстрактов красных листьев винограда культурного четырех сортов: Голубок, Каберне Совиньон, Красностоп Золотовский и Цимлянский черный. Специфичность и достоверность полученных результатов оценивали в сравнении с референтным препаратом Антистакс® (Швейцария), назначаемого при нарушениях венозного кровообращения, и стандартным образцом ресвератрола.

#### *Прогнозирование биологической активности in silico*

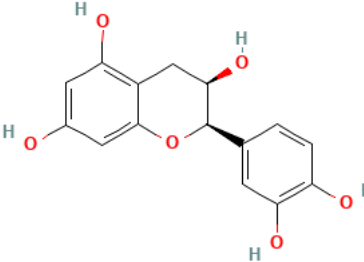
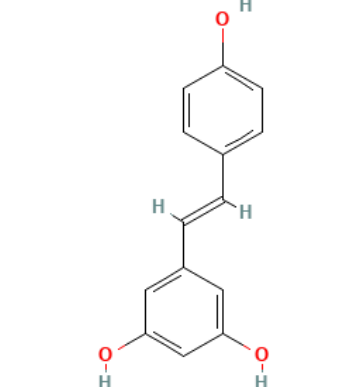
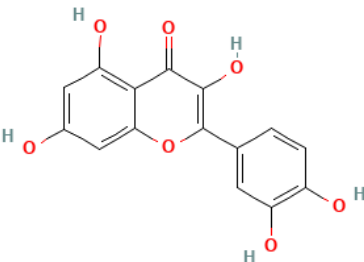
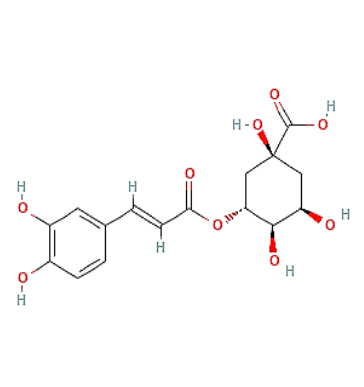
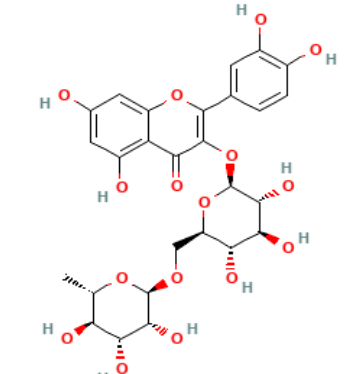
Спрогнозирован спектр биологической активности доминирующих соединений с помощью Программы PASS. Результат прогноза представлен в Таблице 23.

Как видно из Таблицы 23, для доминирующих БАС красных листьев винограда предсказана вероятность проявления биологически активных свойств, свидетельствующих о наличии у них противовоспалительной, антиоксидантной и венотропной активности ( $P_a - P_i > 0,5$ ), что согласуется с литературными данными [20, 282].

**Таблица 23** – Наивысшие значения оценок  $Ra-Pi$ , полученные для преобладающих в экстракте красных листьев винограда культурного БАС

|                                    | <i>Соединение</i>   | <i>Вид активности</i>  | <i>Значение <math>Ra-Pi</math></i>        |
|------------------------------------|---|--|---|
| Кверцетин<br>3,7-диглю-<br>куронид |    | Ингибитор проницаемости мембран<br>Антиоксидантная<br>Венотонизирующая<br>Фибринолитическая                            | 0,901<br>0,857<br>0,808<br>0,745          |
| Кофейная<br>кислота                |   | Ингибитор проницаемости мембран<br>Венотонизирующая<br>Фибринолитическая<br>Антигипоксическая<br>Противовоспалительная | 0,800<br>0,776<br>0,741<br>0,688<br>0,645 |
| Феруловая<br>кислота               |  | Фибринолитическая<br>Венотонизирующая<br>Антигипоксическая<br>Противовоспалительная                                    | 0,756<br>0,746<br>0,726<br>0,658          |
| Дикумарин                          |  | Фибринолитическая<br>Ингибитор проницаемости мембран<br>Венотонизирующая   | 0,549<br>0,539<br>0,468                   |
| Витексин                           |  | Ингибитор проницаемости мембран<br>Венотонизирующая<br>Антиоксидантная<br>Гемостатическая                              | 0,887<br>0,848<br>0,776<br>0,680          |

## Продолжение таблицы 23

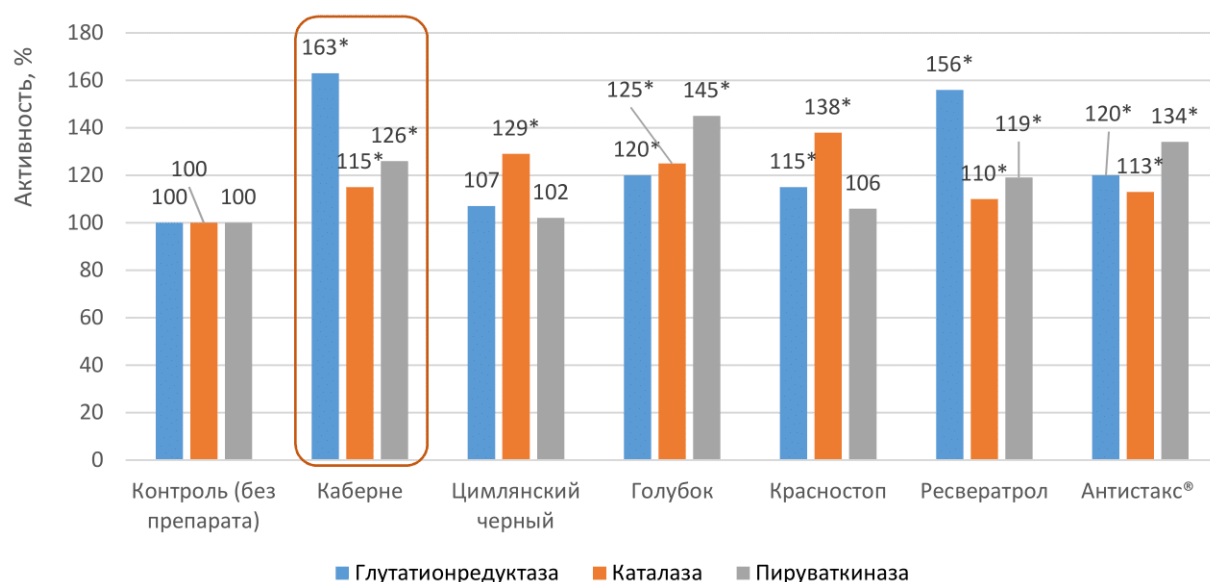
|                      | <i>Соединение</i>   | <i>Вид активности</i>  | <i>Значение Pa-Pi</i>            |
|----------------------|---|--|----------------------------------|
| Эпикатехин           |    | Антиоксидантная<br>Ингибитор проницаемости мембран<br>Ангиопротекторная<br>Гемостатическая | 0,807<br>0,779<br>0,638<br>0,607 |
| Ресвератрол          |    | Ингибитор проницаемости мембран<br>Фибринолитическая<br>Ангиопротекторная                  | 0,796<br>0,756<br>0,752          |
| Кверцетин            |   | Антиоксидантная<br>Гемостатическая<br>Ингибитор проницаемости мембран<br>Ангиопротекторная | 0,936<br>0,904<br>0,845<br>0,770 |
| Хлорогеновая кислота |  | Ингибитор проницаемости мембран<br>Антиоксидантная<br>Антигипоксическая                    | 0,861<br>0,781<br>0,720          |
| Рутин                |  | Гемостатическая<br>Ингибитор проницаемости мембран<br>Ангиопротекторная<br>Антиоксидантная | 0,986<br>0,980<br>0,945<br>0,910 |

### Специфические ферментные биотест-системы *in vitro*

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.

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.

Результаты оценки субстанций из красных листьев винограда культурного, ресвератрола и Антистакс<sup>®</sup> с использованием вторичной СФБТС на основе ГР, КАТ и ПК представлены на Рисунке 21.



**Рисунок 21** – Результаты оценки субстанций из красных листьев винограда культурного, ресвератрола и Антистакс<sup>®</sup> с использованием вторичной СФБТС на основе ГР, КАТ и ПК.

Из представленных на Рисунке 21 данных видно, что наибольшую антиоксидантную и энергизирующую активность проявлял сухой экстракт из красных листьев винограда сорта Каберне Совиньон, превышающую активность всех изученных экстрактов: при внесении его в инкубационную среду скорость ГР- и КАТ реакций увеличивалась на 63 и 15 % соответственно, скорость ПК-реакции – на 26 % по отношению к контролю. Полученные результаты *in vitro* позволяют рекомендовать его как наиболее перспективный для дальнейшего изучения с целью создания средств с венотропными свойствами, в механизме действия которых существенную роль играют антиоксидантные свойства препарата, а также поддержание и пополнение фонда АТФ. Стандартный образец ресвератрола увеличивал скорость ГР-реакции на 56 %, КАТ – на 10 %, ПК – на 19 %, проявляя, таким образом антиоксидантные и энергизирующие свойства, что согласуется с литературными данными [132]. Венотропная активность данного экстракта сопоставима с активностью препарата сравнения Антистакс®. Полученные результаты *in vitro* позволили рекомендовать сухой экстракт из красных листьев винограда сорта Каберне для дальнейшего изучения.

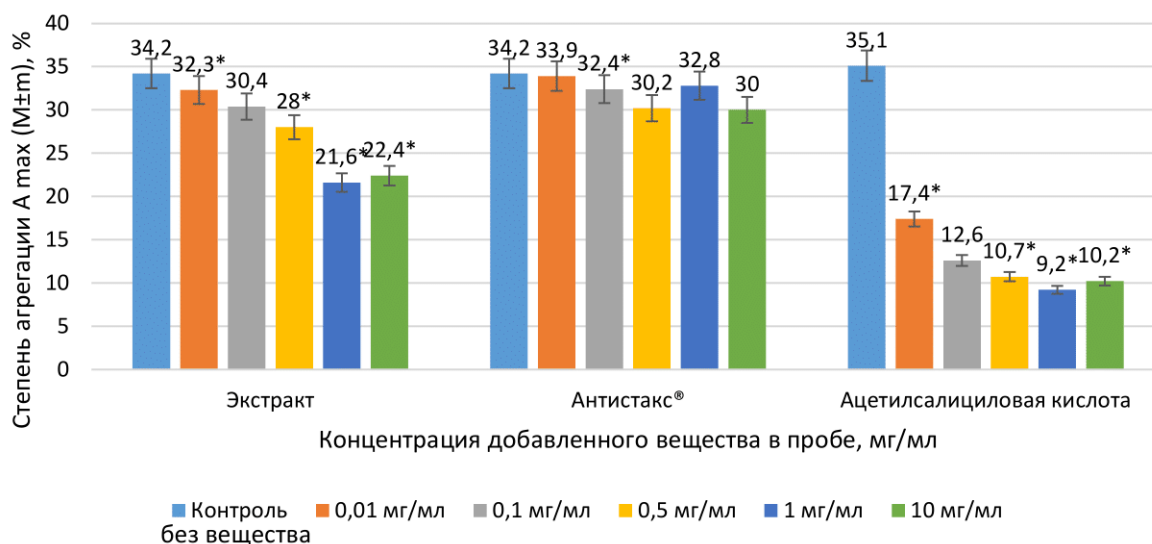
Определяли значения **молекулярных докингов** ведущих БАС в активный сайт ферментов антиоксидантной системы глутатионредуктазы и каталазы, которые находились в интервале от -6,8 до -9,1 ккал/моль для ГР и от -7,3 до -8,5 ккал/моль для КАТ, что свидетельствует о значительной активности экстракта красных листьев винограда культурного в отношении исследуемых белков, наибольшую активность проявляет кверцетин глюкуроид и кверцетин. При исследовании взаимодействия соединений с ГР были выявлены БАС экстракта (кофейная кислота, ресвератрол и кверцетин глюкуроид), которые связывались с двумя ключевыми аминокислотами активного центра – cys58 и cys63. Для кверцетина глюкуроида также был обнаружен альтернативный сайт связывания с КАТ – другое положение в белке относительно основного сайта.

#### *Оценка венотропной активности in vivo*

Установленную с помощью вторичной СФБТС на основе ГР, ПК и КАТ активность выбранного по результатам опытов *in vitro* экстракта красных листьев ви-

нограда культурного сорта Каберне Совиньон сравнивали с результатами, полученными с помощью комплекса фармакологических методик на биотест-системах организменного уровня (мыши, крысы и кролики), позволяющего оценить наличие венотропных свойств у субстанции, в сравнении с препаратом Антистакс® при введении в желудок в дозах 10 и 100 мг/кг. Антистакс® вводили животным в дозе 100 мг/кг [98].

Изучали влияние экстракта на функциональную активность тромбоцитов *in vitro* в условиях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в сравнении с Антистакс® и ацетилсалициловой кислотой; на течение острого экссудативного воспаления; выявляли его антиэкссудативный эффект на модели экспериментального перитонита; капилляроукрепляющую активность в очаге локального ксилолового воспаления; его антиэкссудативную и антипролиферативную активность, а также влияние экстракта на порог болевой чувствительности мышей [98]. Результаты представлены на Рисунках 22–26. Установлено, что экстракт обладает антиагрегационной активностью в условиях АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro*.

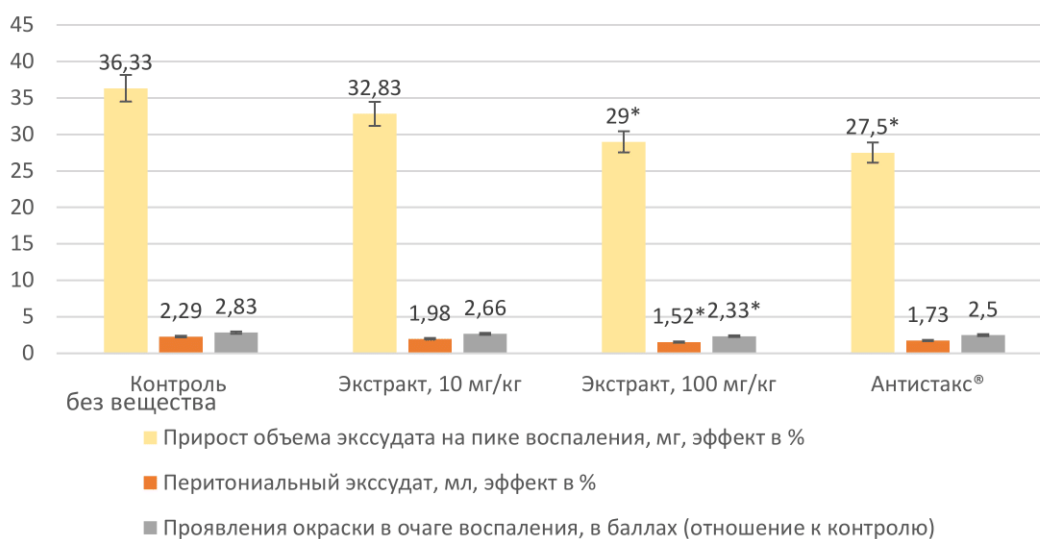


**Рисунок 22** – Влияние экстракта на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*

На модели экспериментального перитонита (Рисунок 23) «выявлен антиэкссудативный эффект экстракта, однократное введение экстракта приводило к укреплению стенок сосудов, снижению скорости выхода трепановой сины в 1,2 раза, по

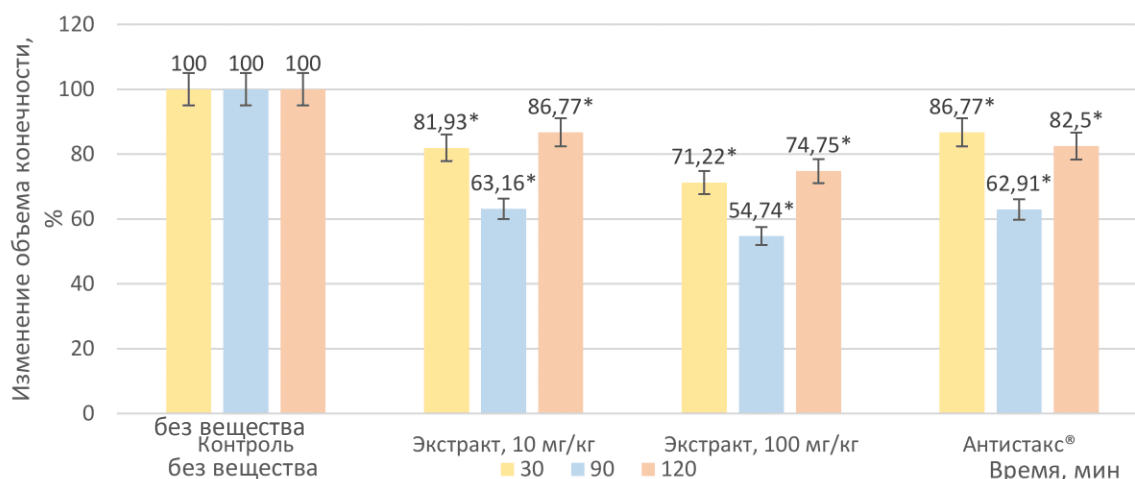


сравнению с контрольной группой. При этом активность экстракта была выше, чем у препарата сравнения» [98].



**Рисунок 23** – Данные по влиянию экстракта на течение острого экссудативного воспаления *in vivo*

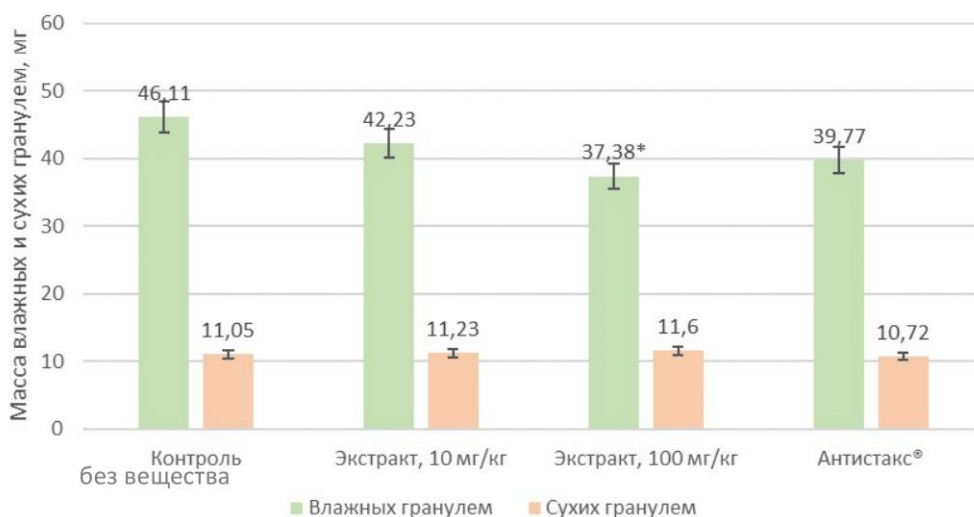
Представленные результаты (Рисунок 24) показывают, что экстракт ускорял резорбцию отека лап быстрее препарата сравнения Антистакс®.



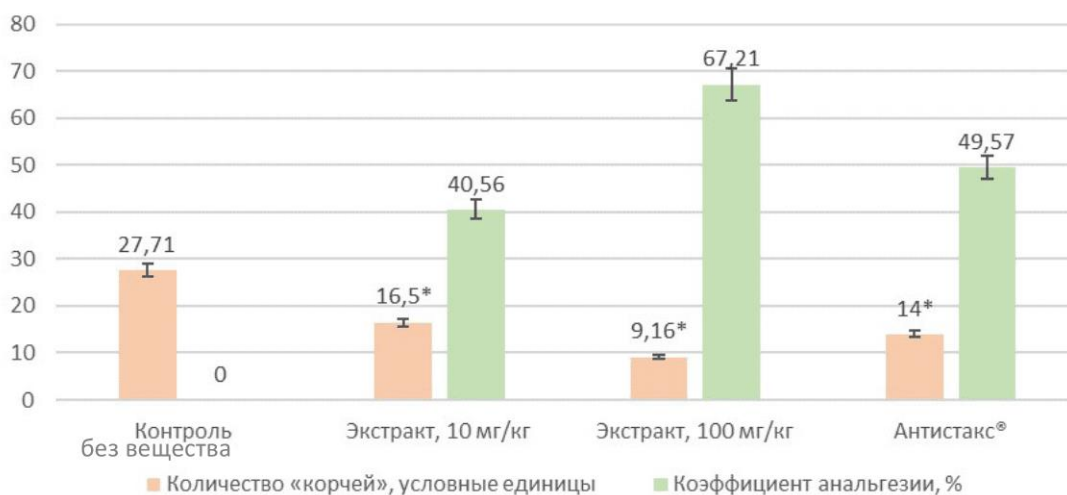
**Рисунок 24** – Данные по антиэкссудативной активности экстракта

Экстракт в дозе 100 мг/кг проявлял антипролиферативную активность, уменьшая массу влажных гранул на 18,9 % по сравнению с контролем.

Результаты, представленные на Рисунке 26, демонстрируют, что при однократном внутривенном введении экстракта снижалось количество специфических ноцицептивных ответов, «корчей», на химический раздражитель.



**Рисунок 25** – Результаты изучения влияния экстракта на хроническое пролиферативное воспаление



**Рисунок 26** – Данные анальгетической активности экстракта в сравнении с Антистакс®

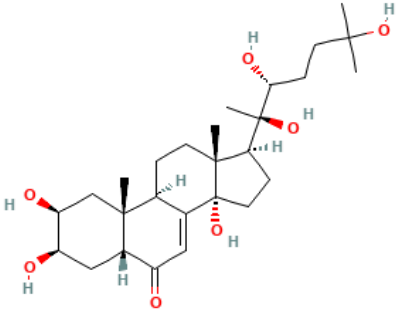
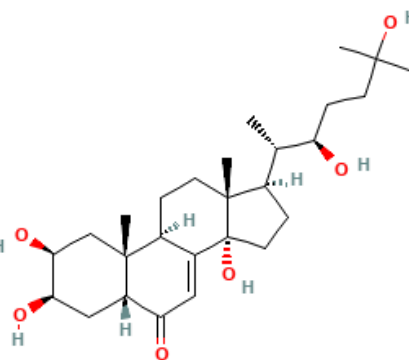
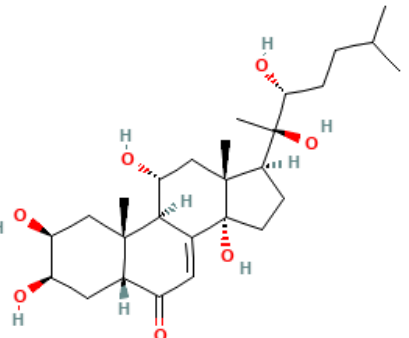
Таким образом, результаты *in vivo* соответствуют данным, полученным с использованием СФБТС, и в совокупности свидетельствуют о венотропных свойствах данной субстанции из нативного сырья.

Полученные результаты позволили создать на основе выбранного экстракта лечебный крем, обладающий противовоспалительными и венотонизирующими свойствами [74].

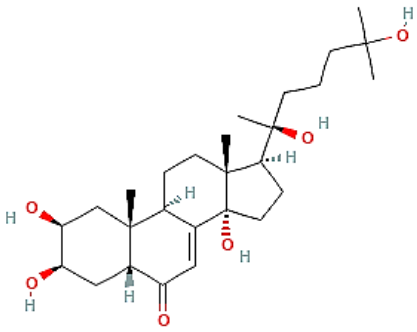
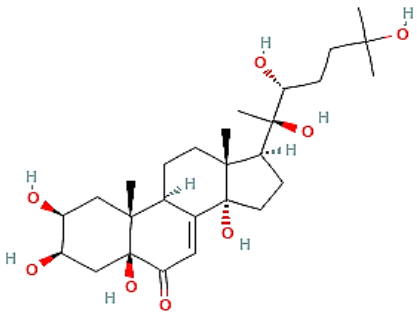
## 6.2 Испытания вторичной СФБТС для оценки адаптогенных свойств биологически активных соединений

Адаптогены обладают способностью регулировать состояние центральной нервной системы, повышать неспецифическую сопротивляемость организма к широкому спектру вредных воздействий физической, химической и биологической природы [44]. В исследования были включены серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) травы экстракты сухие с содержанием в них 20-гидроксиэкдизона 4 %, 7 % и 24 %. В соответствии с результатами их анализа в программе PASS была спрогнозирована активность ключевых БАС экстрактов [63; 81; 211], указанная в Таблице 24.

**Таблица 24** – Наивысшие значения оценок Pa-Pi, полученные для преобладающих в траве серпухи венценосной БАС

|                    | Соединение  | Вид активности   | Значение Pa-Pi                            |
|--------------------|---|--|---|
| 20-гидроксиэкдизон |   | Иммуностимулирующая<br>Гепатопротективная<br>Аналептическая<br>Противовоспалительная<br>Анестезирующая | 0,710<br>0,638<br>0,527<br>0,524<br>0,491 |
| α-экдизон          |  | Гепатопротективная<br>Иммуностимулирующая<br>Противовоспалительная<br>Аналептическая<br>Анестезирующая | 0,782<br>0,663<br>0,602<br>0,571<br>0,507 |
| аюгастерон С       |  | Иммуностимулирующая<br>Противовоспалительная<br>Стимулятор фактора транскрипции NF каппа В             | 0,759<br>0,665<br>0,549                   |

## Продолжение таблицы 24

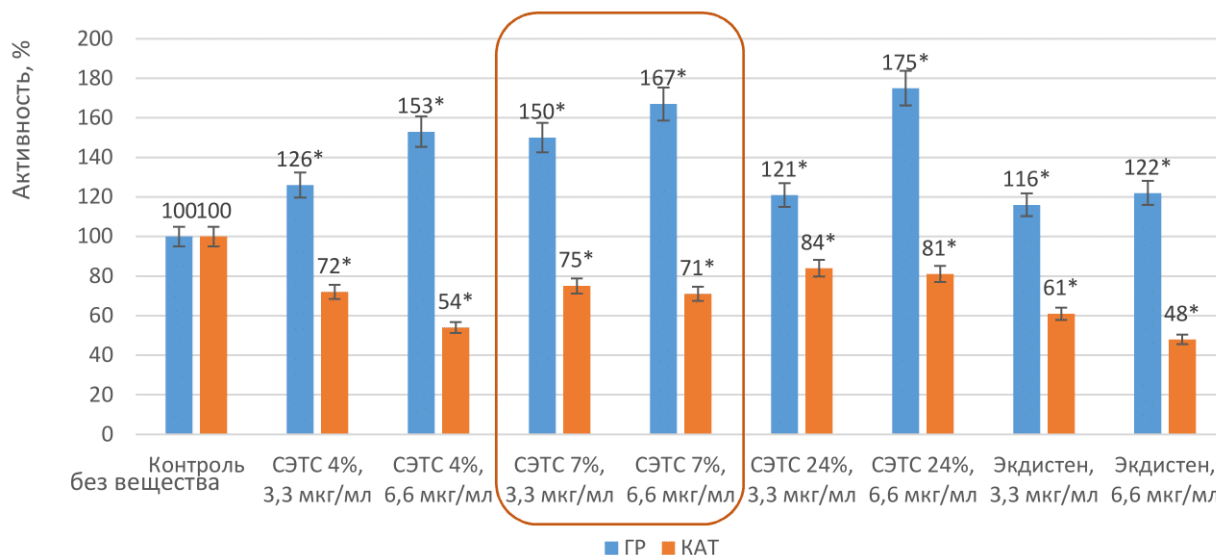
| Соединение  |  | Вид активности   | Значение Pa-Pi                   |
|-------------|--|--|----------------------------------|
| таксистерон |   | Противовоспалительная<br>Противовоспалительная<br>Гепатопротективная<br>Аналептическая | 0,707<br>0,598<br>0,560<br>0,560 |
| полиподин В |  | Иммуностимулирующая<br>Противовоспалительная<br>Противовирусная<br>Кардиотоническая    | 0,659<br>0,584<br>0,560<br>0,548 |

Спрогнозированные свойства доминирующих БАС в экстракте позволяют предполагать наличие у него адаптогенных свойств, что было изучено в опытах *in vitro* с применением вторичной СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы: ранее была показана корреляция между повышением скорости ГР реакции, снижением скорости КАТ реакции *in vitro* и наличием у БАС адаптогенной активности [65].

Результаты оценки адаптогенной активности трех экстрактов травы серпухи венценосной (СЭТС) и препарата сравнения Экдистен<sup>®</sup> (Россия), представляющего собой индивидуальный 20-гидроксиэкдизон, представлены на Рисунке 27.

Из представленных данных видно, что в опытах *in vitro* была выявлена адаптогенная активность изученных субстанций, а образец с содержанием 20-гидроксиэкдизона 7 % является наиболее перспективным, так как он обладает более выраженным влиянием на активность и ГР и КАТ: при внесении его в инкубационную среду в концентрации 6,6 мкг/мл скорость глутатионредуктазной реакции увеличилась на 67 %, а каталазной снижалась на 29 %. Препарат сравнения Экдистен<sup>®</sup>

(природное индивидуальное соединение стероидной структуры) также проявлял адаптогенные свойства, увеличивая скорость ГР и ингибируя КАТ на 52 % по отношению к контролю, что согласуется с литературными данными [144; 146].



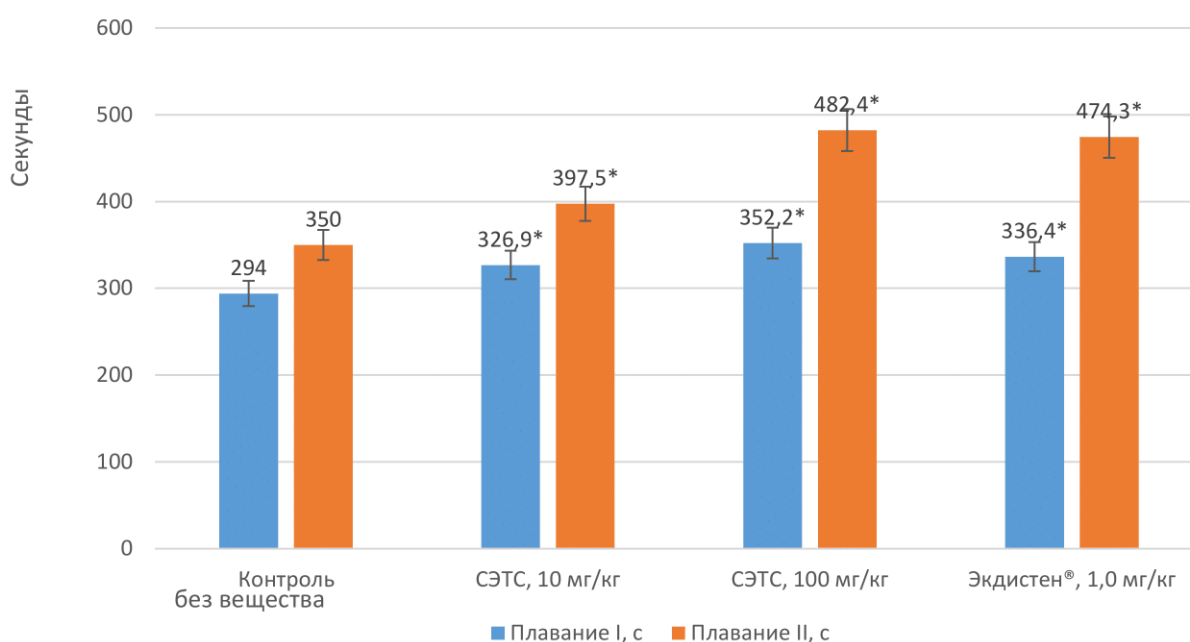
**Рисунок 27** – Результаты оценки субстанций из травы серпухи венценосной и Экдистен® с использованием вторичной СФБТС на основе ГР и КАТ

Результаты **молекулярного докинга** перечисленных в Таблице 24 основных БАС серпухи венценосной травы экстракта сухого в активные сайты ГР и КАТ показали энергию их взаимодействия в интервале от -8,3 до -9,0 для ГР и от -7,8 до -9,5 для КАТ, наибольшую активность проявляли 20-гидроксиэкдизон, экдизон и аюгастерон С. При этом стоит отметить, для экдизона и аюгастерона-С был выявлен альтернативный сайт связывания с ГР, а для 20-гидроксиэкдизона и аюгастерона-С установлено их связывание с гемом КАТ.

Проводили сравнительное изучение адаптогенной активности выбранного *in vitro* экстракта с применением биотест-систем организменного уровня на моделях «вынужденное плавание с грузом» и гипоксической гипоксии с гиперкапнией. Для выявления основных параметров поведения и неврологического статуса лабораторных животных в условиях кратковременного психоэмоционального стресса проводили опыт на установке «открытое поле норкового типа», отличающейся отсутствием боковых стенок и, вследствие этого, более высокой стрессогенностью. Ис-

следования *in vivo* были осуществлены на белых нелинейных мышах-самцах исходной массой тела 18,0–22,0 г и белых нелинейных крысах-самцах массой тела 180,0–220,0 г.

Результаты изучения влияния 4-дневного введения экстракта на модели «вынужденное плавание с грузом» представлены на Рисунке 28.



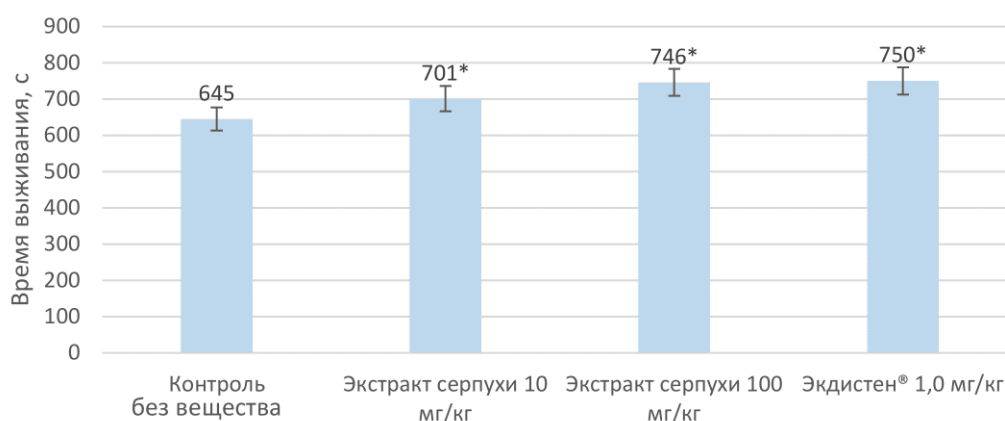
**Рисунок 28** – Результаты изучения влияния экстракта серпухи на физическую работоспособность и выносливость мышей

Как видно из данных, представленных на Рисунке 27, при сравнительном изучении влияния экстракта серпухи и препарата сравнения Экдистен® на работоспособность и выносливость мышей в тесте «Вынужденное плавание с грузом», они не оказывают достоверного негативного влияния на изучаемые показатели, что свидетельствует об отсутствии у них миорелаксирующего действия.

Следует отметить, что экстракт серпухи в дозе 10 мг/кг увеличивал работоспособность на 11 %, а выносливость животных на 13 % по сравнению с контролем. В дозе 100 мг/кг изучаемый экстракт достоверно увеличивал выносливость на 20 %, а работоспособность на 38 % по сравнению с контролем. В то время как препарат сравнения Экдистен® увеличивал работоспособность на 14 %, а выносливость мышей на 35 % по сравнению с контролем.

Таким образом, установлено, что БАС экстракт травы серпухи венценосной с содержанием 20-гидроксиэкдизона 7 % в дозе 100 мг/кг оказывал достоверно выраженное положительное влияние на работоспособность и выносливость лабораторных животных.

Проведено изучение влияния экстракта в дозах 10 и 100 мг/кг на продолжительность жизни мышей в тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией в гермообъеме. Фиксировалась длительность жизни каждого животного в банке от момента герметизации банки до последнего заметного дыхательного движения (независимо от предшествующих терминальных судорог). Результаты исследования представлены на Рисунке 29.



**Рисунок 29** – Результаты изучения влияния экстракта серпухи на время выживания мышей в гермообъеме

В результате проведенных экспериментов установлено, что экстракт в дозе 10 мг/кг увеличивал среднее время выживания лабораторных животных в гермообъеме на 9 %, а в дозе 100 мг/кг – на 16 %, что свидетельствовало об его антигипоксической активности. Антигипоксическая активность экстракта серпухи в дозе 100 мг/кг сопоставима с активностью препарата сравнения экдистен.

Изучение основных параметров поведения и неврологического статуса лабораторных животных в условиях кратковременного психоэмоционального стресса проводили на установке «открытое поле норкового типа». Тест позволяет определять двигательную-ориентировочную и исследовательскую активность животных, уровень эмоциональности, выявить неврологические нарушения (дрожь, подерги-

вания век, щек, мигания), а также аномальное поведение: стереотипию, встряхивания. Было показано, что изучаемый экстракт не оказывал отрицательного влияния на нервную систему и поведение опытных животных.

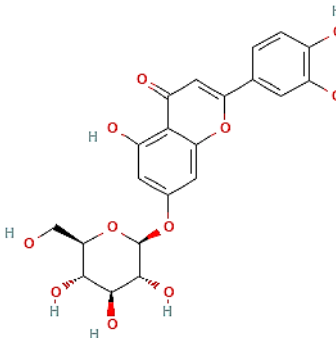
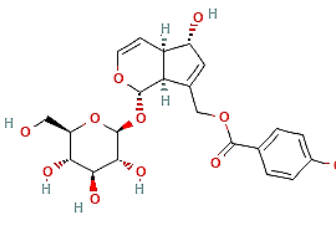
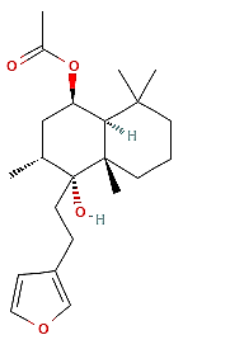
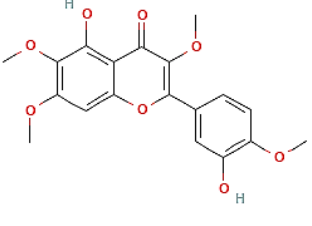
Таким образом, с применением вторичной СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы была оценена адаптогенная активность трёх экстрактов травы серпухи с различным содержанием 20-гидроксиэкдизона. По результатам опытов *in vitro* был выбран экстракт, содержащий 7 % 20-гидроксиэкдизона. С использованием биотест-систем организменного уровня показано, что он проявлял антигипоксическую активность, увеличивая среднее время выживания животных в гермообъеме в дозе 100 мг/кг – на 16 %; увеличивал на 38 % физическую работоспособность и на 20 % выносливость животных; не оказывал отрицательного влияния на нервную систему и поведение лабораторных животных на модели «открытое поле» норкового типа.

### **6.3 Испытания первичной СФБТС для оценки дофаминергических свойств биологически активных соединений**

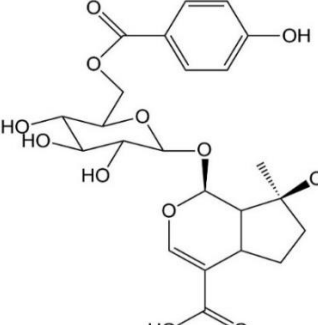
Исследования проводили на примере сухих экстрактов плодов витекса священного (*Vitex agnus-castus* L.) и витекса китайского (*Vitex negundo* L.). При сравнении хроматографического профиля экстрактов плодов витекса священного и витекса китайского было установлено, что их качественный состав схож, в них присутствуют фенолкарбоновые кислоты, флавоноиды, иридоиды и терпеноиды, однако три соединения являются дифференцирующими: кастицин [270], 6'-О-п-гидроксибензоилмусаенозидная кислота, третье соединение не идентифицировано [2]. 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 Циклодедон®. С помощью программы PASS проанализированы основные доминирующие компоненты экстрактов витекса китайского и витекса священного [2; 101; 336]. Результаты представлены в Таблице 25.



**Таблица 25** – Наивысшие значения оценок Pa-Pi, полученные для преобладающих в сухих экстрактах плодов витекса священного и витекса китайского БАС

| Соединение  | Вид активности   | Значение Pa-Pi   |
|---|--|--|
| Лютеолин-7-<br>глюкозид  | Кровоостанавливающая<br>Антиоксидантная<br>При ломкости капилляров<br>Ингибитор ксантиноксидазы<br>Агонист апоптоза<br>Усилитель нейротропного фактора<br>Антиоцицептивная<br>Ингибитор высвобождения медиаторов | 0,898<br>0,865<br>0,850<br>0,793<br>0,769<br>0,672<br>0,541<br>0,531 |
| Агнузид                 | Антиоксидантная<br>Антитромботическая<br>Стимулятор фактора транскрипции NF каппа В  | 0,785<br>0,730<br>0,537  |
| Ротундифуран           | Агонист апоптоза<br>Противовоспалительная<br>Антагонист гестагеновых рецепторов<br>Ингибитор овуляции  | 0,827<br>0,660<br>0,560<br>0,464                                     |
| Кастицин               | Агонист апоптоза<br>Противовоспалительная<br>Антиоксидантная<br>Ингибитор экспрессии AR<br>Кровоостанавливающая<br>Антагонист нейротрансмиттеров<br>Ингибитор овуляции   | 0,891<br>0,815<br>0,711<br>0,688<br>0,638<br>0,526<br>0,400          |

## Продолжение таблицы 25

| Соединение                                 | Вид активности  | Значение Pa-Pi   |
|--|---|--|
| 6'-О-п-гидроксибензоилмусанозидная кислота |  <p>Противовоспалительная<br/>         Антиоксидантная<br/>         Антитромботическая<br/>         Стимулятор фактора транскрипции NF каппа В<br/>         При деменции</p> | <p>0,867<br/>         0,833<br/>         0,730<br/>         0,537<br/>         0,494</p> |

Из литературных данных следует, что механизмом действия БАС плодов витекса священного является их взаимодействие с дофаминовыми рецепторами гипоталамо-гипофизарной системы [321]. Учитывая сведения из литературных источников [169; 250] и спрогнозированные биологические эффекты для выявления дофаминергических свойств экстрактов витекса священного и витекса китайского, использовали СФБТС на основе тирозингидроксилазы в условиях опытов *in vitro* [59]. Фермент тирозингидроксилаза является лимитирующим и ключевым звеном дофаминовой нейромедиаторной системы, играющей важную роль не только в функционировании центральной нервной системы в целом, но и в нейрогормональной регуляции обмена веществ, в том числе – в дофаминергическом контроле регуляции секреции пролактина.

Скорость каталитической реакции оценивали относительно контрольного опыта без внесения ингибиторов. В качестве сравнения приведены скорости реакции с добавлением дофамина – естественного ингибитора тирозингидроксилазы, и препарата сравнения – Циклодинон®. Результаты представлены в Таблице 26.

Из представленных результатов видно, что дофамин значительно тормозил скорость каталитической реакции *in vitro*, образцы экстракта витекса священного и Циклодинон® снижали скорость ферментативной реакции. Влияние других образцов на активность тирозингидроксилазы было значительно слабее дофамина. Важным выводом является то, что экстракт витекса китайского достоверного влияния на активность фермента не оказывал, и таким образом, не проявлял дофаминергических свойств.

**Таблица 26** – Результаты оценки субстанций из плодов витекса священного и витекса китайского, агнузида и Циклодинон® с использованием первичной СФБТС на основе ТГ

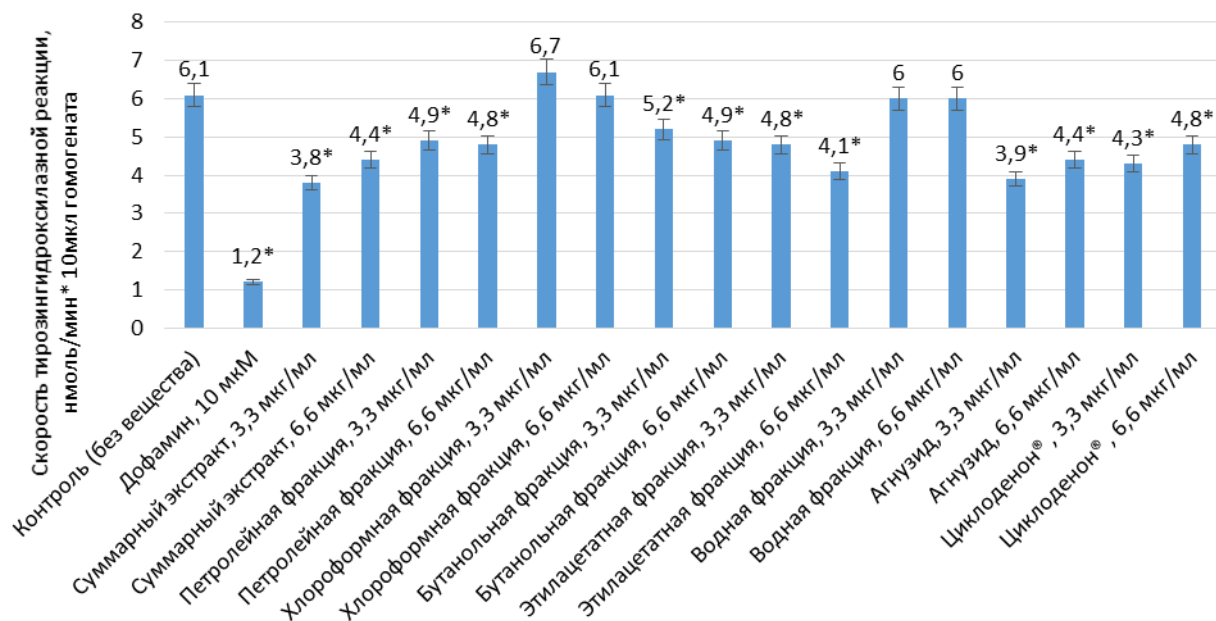
| Вариант опыта   |            | Скорость реакции, М±m         |     |
|---|------------|-------------------------------|-----|
|   |            | нмоль/мин на 10мкл гомогената | %   |
| Контроль  |            | 25,0±1,13                     | 100 |
| Дофамин, 10 мкМ                                       |            | 5,5±0,26*                     | 22  |
| Экстракт прутняка священного                          | 3,3 мкг/мл | 21,2±1,0*                     | 85  |
| Экстракт прутняка китайского                          | 3,3 мкг/мл | 24,2±1,1                      | 97  |
| Циклодинон®*  | 3,3 мкг/мл | 17,7±0,85*                    | 71  |
| <i>Примечание – * – в пересчете на сухой экстракт</i> |            |                               |     |

### *СФБТС для выявления целевой группы БАС*

СФБТС можно использовать и для выявления группы вторичных метаболитов, обладающих наибольшей дофаминергической активностью. Для этого изучали влияние отдельных фракций БАС плодов витекса священного различной полярности на активность тирозингидроксилазы. В качестве препарата сравнения использовали Циклодинон®, также был исследован иридоид агнузид (стандартизован, чистота не менее 96 %) – доминирующий компонент плодов витекса священного [101].

На Рисунке 29 представлены результаты определения активности тирозингидроксилазы в присутствии исследуемых фракций, препарата сравнения и стандартного образца агнузида в условиях опытов *in vitro*.

Как видно из Рисунка 30, дофамин, природный ретроингибитор тирозингидроксилазы и агонист дофаминовых рецепторов, *in vitro* значительно тормозил скорость реакции. Образцы суммарного экстракта, бутанольной, этилацетатной, петролейной фракций, агнузид, а также препарат сравнения Циклодинон® оказывали угнетающее действие на активность тирозингидроксилазы. Однако количественно эффекты всех образцов были значительно слабее эффекта дофамина. Так, в присутствии образца этилацетатной фракции в концентрации 3,3 мкг/мл скорость реакции составляла 68 % от скорости реакции в контроле, в присутствии образца петролейной фракции в большей концентрации – 80 %, в присутствии агнузида (3,3 мкг/мл) – 64 %, в присутствии суммарного экстракта (3,3 мкг/мл) – 61 %.



**Рисунок 30** – Результаты оценки фракций экстракта плодов витекса священного, агнузида и Циклоденон® с использованием первичной СФБТС на основе ТГ

Стоит отметить, что в большей концентрации препарат сравнения Циклодинон® ингибировал фермент слабее: 70 % в присутствии образца в концентрации 6,6 мкг/мл против 79 % при концентрации 3,3 мкг/мл. Аналогичную тенденцию, обратный дозозависимый эффект, продемонстрировал и суммарный экстракт.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что суммарный экстракт плодов витекса священного и препарат Циклодинон® обладали сопоставимой дофаминергической активностью в условиях проведенного эксперимента. Это может свидетельствовать о синергическом действии компонентов на дофаминовую нейромедиаторную систему [62] и показывает целесообразность использования суммарного экстракта плодов витекса священного.

Среди фракций БАС наибольшую активность показала этилацетатная, в состав которой входят протокатеховая кислота, хлорогеновая кислота, п-гидроксибензойная кислота, лютеолин-7-гликозид и его изомер, агнузид, 6'-О-р-гидроксибензоилмусаенозидная кислота, витексин, апигенин.

При доклинических исследованиях дофаминергической активности проводят исследования *in vitro* (например, определяют способность БАС вытеснять меченый радиоактивный <sup>125</sup>I-сульпирид из его связи с рекомбинантным человеческим D<sub>2</sub>-

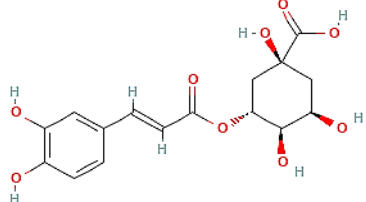
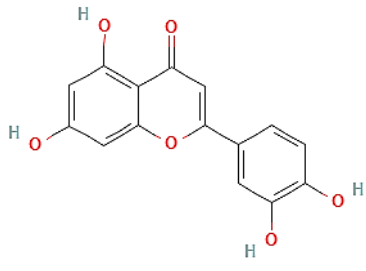
рецептором, сравнивая с такой же способностью дофамина в известной концентрации, в той же экспериментальной системе [236]), не используя модели на лабораторных животных. Поэтому применение СФБТС на основе тирозингидроксилазы для оценки данного вида активности является оправданным.

#### 6.4 Испытания вторичной СФБТС для оценки гепатопротективных свойств биологически активных соединений

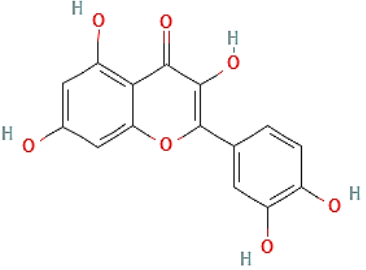
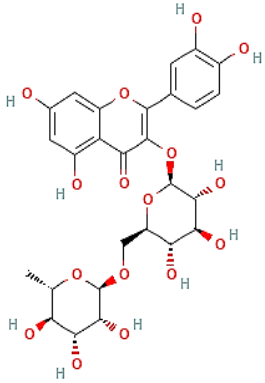
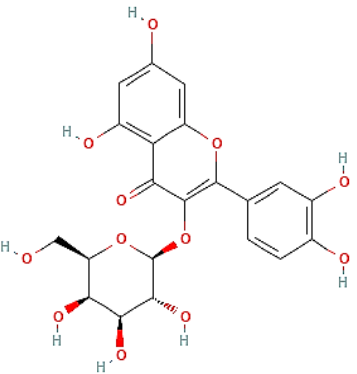
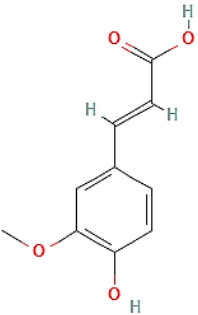
Одним из перспективных объектов для создания на его основе гепатопротекторного средства растительного происхождения является трава володушки золотистой [30; 89; 111].

С помощью Программы PASS была спрогнозирована биологическая активность доминирующих БАС (Таблица 27).

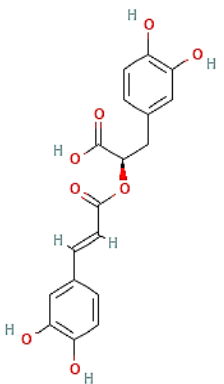
**Таблица 27** – Наивысшие значения оценок Pa-Pi, полученные для преобладающих в траве володушки золотистой БАС

| <i>Соединение</i>   | <i>Вид активности</i>   | <i>Значение Pa-Pi</i>                |
|---|---|--------------------------------------|
| Хлорогеновая кислота<br> | Желчегонная активность<br>Ингибитор проницаемости мембран<br>Антиоксидантная<br>Антигипоксическая | 0,919<br><br>0,860<br>0,781<br>0,720 |
| Лютеолин<br>             | Активатор CYP1A<br>Антиоксидантная<br>Гепатопротективная  | 0,930<br>0,774<br>0,649              |

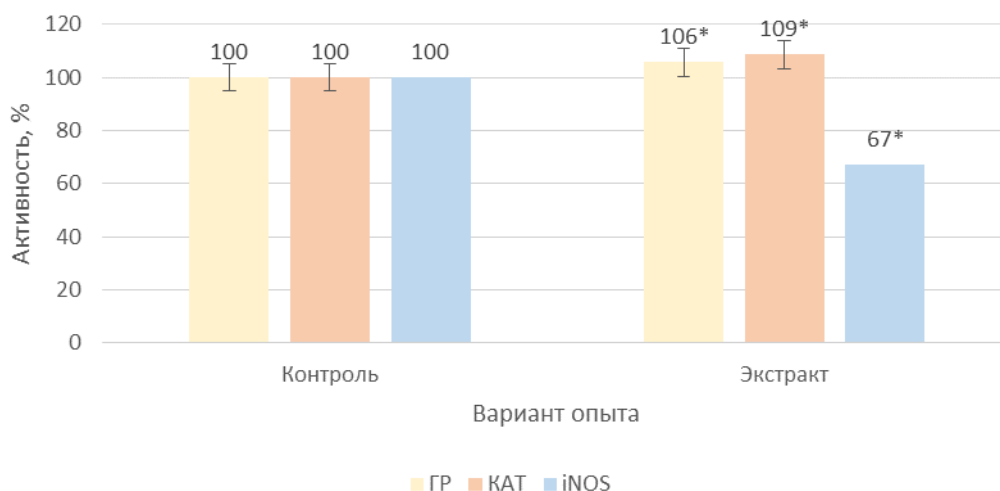
## Продолжение таблицы 27

| <i>Соединение</i>   | <i>Вид активности</i>   | <i>Значение Pa-Pi</i>                     |
|---|---|---|
| Кверцетин            | Антиоксидантная<br>Ингибитор проницаемости мембран<br>Гепатопротективная<br>Противовоспалительная | 0,936<br>0,845<br>0,800<br>0,602          |
| Рутин               | Ингибитор проницаемости мембран<br>Антиоксидантная<br>Противовоспалительная                       | 0,980<br>0,910<br>0,728                   |
| Гиперозид          | Ингибитор проницаемости мембран<br>Гепатопротективная<br>Антиоксидантная<br>Противовоспалительная | 0,980<br>0,960<br>0,910<br>0,728          |
| Феруловая кислота  | Желчегонная<br>СУР2J субстрат<br>Антигипоксическая<br>Противовоспалительная<br>Гепатопротективная | 0,860<br>0,775<br>0,728<br>0,658<br>0,610 |

## Продолжение таблицы 27

| Соединение  | Вид активности  | Значение Pa-Pi          |
|---|---|-------------------------|
| Розмариновая кислота<br> | Антигипоксическая<br>Ингибитор проницаемости мембран<br>Антиоксидантная | 0,919<br>0,763<br>0,544 |

Из представленных результатов видно, что практически все указанные в Таблице 27 БАС из травы володушки золотистой обладают противовоспалительными, антиоксидантными и гепатопротективными свойствами. Согласно данным литературы, фармакологический эффект растений рода Володушка связывают с активным антиоксидантным действием комплекса БАС, направленным на предотвращение окислительного стресса [29; 108; 205]. В связи с этим на следующем этапе оценивали гепатопротективные свойства экстракта с использованием вторичной СФБТС: на основе индуцибельной NO-синтазы для выявления противовоспалительных свойств и на основе каталазы и глутатионредуктазы – для выявления антиоксидантной активности. Результаты представлены на Рисунке 31.



**Рисунок 31** – Результаты оценки субстанций из травы володушки золотистой с использованием первичной СФБТС на основе GP, KAT и iNOS

Из представленных на Рисунке 30 данных видно, что экстракт оказывал слабое антиоксидантное действие, активируя глутатионредуктазу и каталазу (на 6 % и 9 % соответственно), что может свидетельствовать о низкой специфичности БАС экстракта к данным ферментам. При этом он проявлял противовоспалительные свойства, снижая скорость iNOS-реакции на 33 % по отношению к контролю. Полученные данные согласовываются с результатами *in vivo* [47].

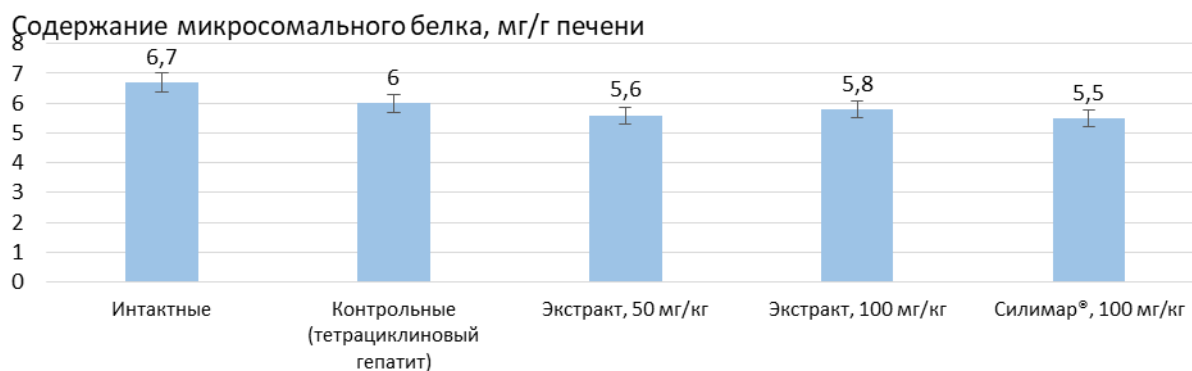
Проявление противовоспалительных свойств БАС экстракта, установленное с помощью **молекулярного докинга**, может быть следствием высокой энергии связывания БАС с гемом индуцибельной NO-синтазы, равной для хлорогеновой кислоты: 9,60 ккал/моль; для кверцетина: -9,20 ккал/моль. Слабое антиоксидантное действие данного препарата, по-видимому, связаны с тем, что БАС в его составе взаимодействуют с cys58 в активном центре глутатионредуктазы и в то же время не взаимодействуют с гемом каталазы, хотя и находятся в активном сайте и имеют среднюю энергию связывания.

В связи с установленной с использованием СФБТС противовоспалительной и слабовыраженной антиоксидантной активностью экстракта, а также данных *in silico*, позволяющих предположить наличие у него гепатопротективных свойств, для их подтверждения целесообразности использования СФБТС использовали биотест-системы организменного уровня на модели тетрациклинового гепатита [13] в сравнении с Силимар<sup>®</sup>, основными БАС которого являются флаволигнаны, обладающие гепатопротективной активностью [305].

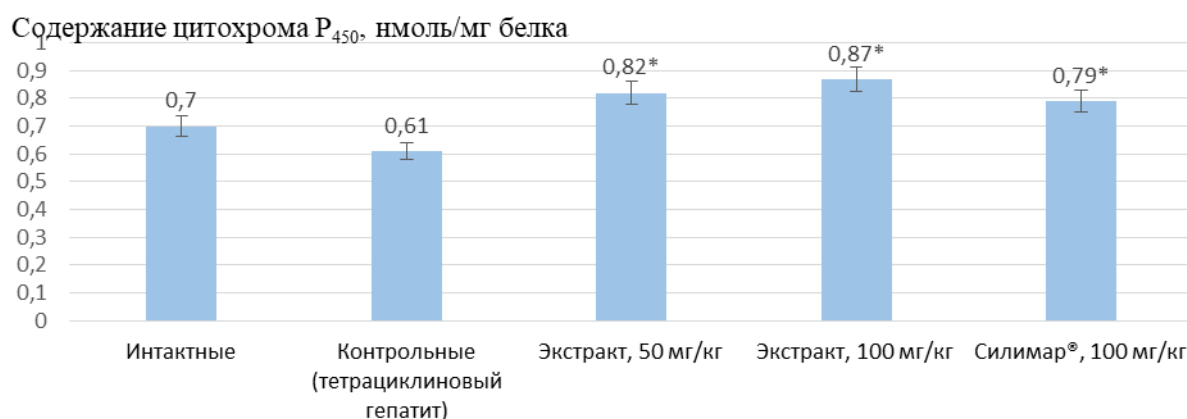
Результаты представлены на Рисунках 32 и 33.

В микросомах печени контрольных крыс при тетрациклиновом гепатите происходит уменьшение количества белка по сравнению с интактными животными (с  $6,67 \pm 0,23$  мг до  $6,06 \pm 0,42$  мг) и цитохрома P<sub>450</sub> (с  $0,705 \pm 0,01$  нмоль/мг белка до  $0,613 \pm 0,03$  нмоль/мг белка), свидетельствующее о токсическом воздействии тетрациклина на печень.





**Рисунок 32** – Результаты изучения влияния экстракта на содержание микросомального белка в условиях модели тетрациклинового гепатита у крыс



*Примечание* – \* – достоверность различий по сравнению с контролем (тетрациклиновый гепатит) при  $p < 0,05$

**Рисунок 33** – Результаты изучения влияния экстракта на содержание цитохрома P<sub>450</sub> в условиях модели тетрациклинового гепатита у крыс

У опытных групп, получавших дополнительно экстракт в дозах 50 мг/кг, 100 мг/кг и Силимар®<sup>®</sup>, по сравнению с контрольными животными при незначительном снижении общего количества микросомального белка наблюдалось достоверное увеличение содержания цитохрома P<sub>450</sub>, что может свидетельствовать о компенсаторной индукции цитохрома P<sub>450</sub> в печени под действием объектов исследования на фоне токсического воздействия антибиотика. Полученные данные по содержанию цитохрома P<sub>450</sub> на 1 мг белка в группах животных, получавших экстракт, свидетельствует об его эффективном индуцирующем действии по сравнению с силимаром на модели тетрациклинового гепатита [48]. Полученные данные были подтверждены на модели острого токсического гепатита, вызванного однократным введением сулемы [51].

Таким образом, с использованием экспериментальных моделей *in vivo* подтверждена целесообразность использования вторичной СФБТС на основе каталазы, глутатионредуктазы и индуцибельной NO-синтазы.

### Выводы по главе 6

1. На примере оценки венотропной активности БАС красных листьев винограда культурного опробировали сочетание глутатионредуктазной, пируваткиназной и каталазной первичных специфических биотест-систем. Как показали результаты изучения влияния субстанций из красных листьев винограда культурного в сравнении со стандартным образцом ресвератрола и референтного препарата Антистакс® *in vitro*, наиболее выраженные антиоксидантные и энергизирующие свойства проявил экстракт из красных листьев винограда сорта Каберне Совиньон, который был рекомендован для дальнейших фармакологических исследований для создания на его основе лекарственного препарата венотропного действия.

2. На примере субстанций из травы серпухи венценосной с различным содержанием 20-гидроксиэкдизона показана целесообразность использования вторичной СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы для оценки их адаптогенной активности. 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.

3. На примере субстанций из плодов витекса священного и витекса китайского исследуемых субстанций показана эффективность применения СФБТС на основе тирозингидроксилазы (лимитирующее звено дофаминовой нейромедиаторной системы) для оценки дофаминергического действия БАС. В опытах *in vitro* установлено, что сухой экстракт плодов витекса священного и препарат Циклодинон® (ЖЛФ – капли для приёма внутрь) 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.

4. Таким образом, применение первичных и вторичных СФБТС, входящих в БК-СФБТС, целесообразно при оценке БАС различного происхождения, что продемонстрировано в данной главе на примере субстанций, полученных из нативных как дикорастущих, так и культивируемых открытого и защищенного грунта.

5. На основании проведенных исследований оформлены Методические рекомендации по применению специфических ферментных биотест-систем *in vitro* при исследовании биологической активности растительных объектов, рег. № М-04868244-95-2022 от 23.03.2022 (Приложение Р).

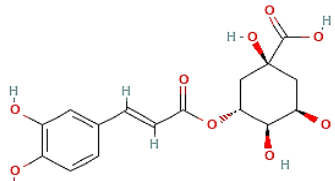
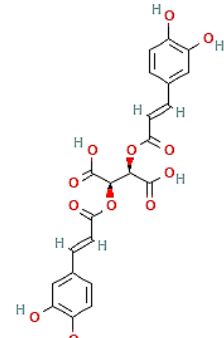
## Глава 7. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ

Функциональные возможности СФБТС широки: их целесообразно применять для направленного первичного скрининга, изучения молекулярного механизма действия, экспресс-оценки качества растительного сырья, для оптимизации технологии экстрагирования целевых биологически активных соединений из растительного сырья, для поиска маркеров стандартизации фитообъектов и т.д., что продемонстрировано с данной главе.

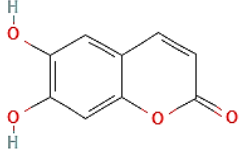
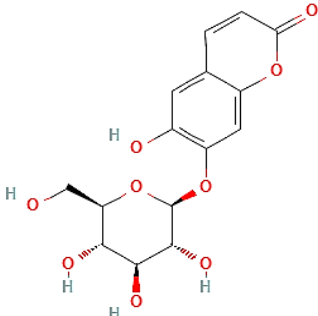
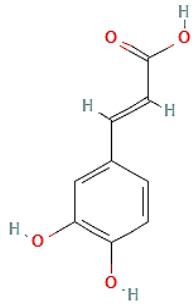
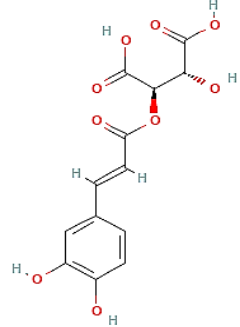
Функциональные возможности СФБТС демонстрировали на примере субстанций из травы дикорастущего и листьев культивируемого цикория обыкновенного.

С помощью программы PASS проанализированы основные компоненты экстрактов, результаты представлены в Таблице 28.

**Таблица 28** – Наивысшие значения оценок Pa-Pi, полученные для преобладающих в надземной части цикория обыкновенного БАС

| <i>Соединение</i>   | <i>Вид активности</i>  | <i>Значение Pa-Pi</i>                              |
|---|--|--|
| Хлорогеновая кислота<br> | Желчегонная активность<br>Ингибитор проницаемости мембран<br>Антиоксидантная<br>Антигипоксическая<br>Иммуносупрессивная<br>Иммуностимулирующая | 0,919<br>0,860<br>0,781<br>0,720<br>0,626<br>0,373 |
| Цикориевая кислота<br>   | Антиоксидантная<br>Антигипоксическая<br>Противовоспалительная<br>При лечении заболеваний печени<br>Иммуностимулирующая                         | 0,887<br>0,787<br>0,696<br>0,547<br>0,347          |

## Продолжение таблицы 28

| Соединение   | Вид активности  | Значение $P_a-P_i$  |
|--|---|---|
| Эскулетин             | CYP2C12 субстрат<br>CYP2B5 субстрат<br>Ингибитор экспрессии JAK2<br>Колонистимулирующий фактор макрофагов<br>CYP3A4 субстрат<br>Противовоспалительная<br>Антиоксидантная  | 0,937<br>0,840<br>0,777<br>0,713<br>0,577<br>0,501<br>0,492 |
| Цикориин             | Антагонист рецепторов анафилатоксина<br>Ингибитор проницаемости мембран<br>Гепатопротективная<br>CYP2C9 индуктор<br>Стимулятор высвобождения гистамина<br>Антиоксидантная | 0,929<br>0,895<br>0,829<br>0,788<br>0,729<br>0,707          |
| Кофейная кислота    | CYP2J субстрат<br>Ингибитор экспрессии JAK2<br>Антигипоксическая<br>Гепатопротективная<br>Противовоспалительная   | 0,881<br>0,875<br>0,833<br>0,849<br>0,653                   |
| Кафтаровая кислота  | Антигипоксическая<br>CYP2J субстрат<br>Ингибитор экспрессии JAK2<br>Антиоксидантная<br>Противовоспалительная  | 0,901<br>0,762<br>0,762<br>0,707<br>0,507                   |

Из представленных в Таблице 28 данных видно, что для основных БАС в надземной части цикория обыкновенного *in silico* с вероятностью  $P_a - P_i > 0,5$  спрогнозирована антиоксидантная, противовоспалительная, гепатопротективная и иммуномодулирующая активность.

### **7.1 Скрининг биологической активности соединений**

В связи с данными *in silico* проводили скрининг биологической активности субстанций из надземной части культивируемого и дикорастущего цикория обыкновенного.

Для выявления:

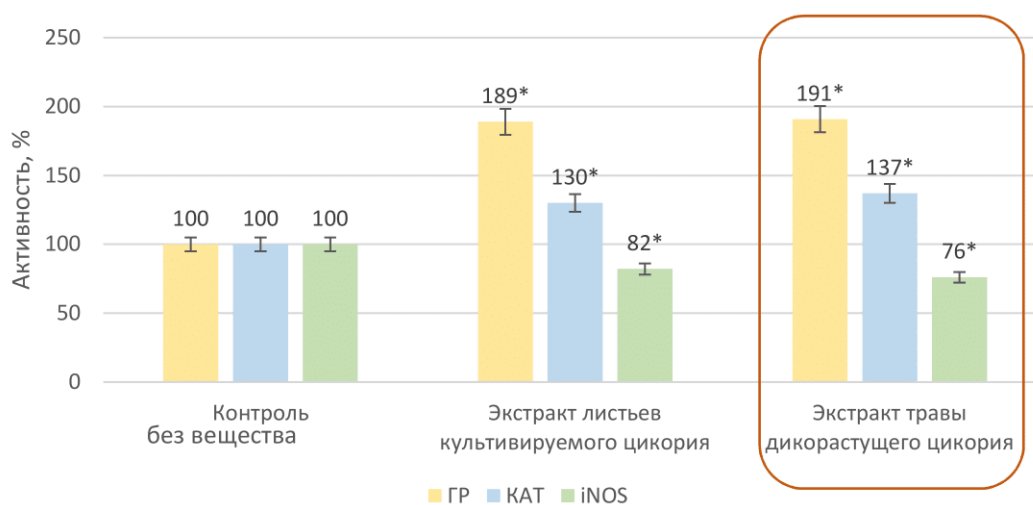
- антиоксидантной активности БАС использовали вторичную СФБТС на основе глутатионредуктазы и каталазы,
- противовоспалительной – первичную СФБТС на основе iNO-синтазы;
- гепатопротективной – вторичную СФБТС на основе цитохрома P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазы;
- иммуномодулирующей – первичную СФБТС на основе НАДФН-оксидазы.

#### **7.1.1 Испытания СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы, а также индуцибельной NO-синтазы**

Для оценки противовоспалительных свойств БАС надземной части дикорастущего и культивируемого цикория обыкновенного использовали первичную СФБТС на основе индуцибельной NO-синтазы, а вторичную СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы – для оценки антиоксидантной активности. Результаты представлены на Рисунке 33.

Как видно из данных, представленных на Рисунке 34, оба экстракта проявляли антиоксидантную активность, ускоряя глутатионредуктазную и каталазную реакции [67], а также противовоспалительную активность, снижая скорость реакции, катализируемой индуцибельной NO-синтазой [95], играющие важную роль в механизме гепатопротективного действия [214]. Более выраженное действие на ак-

тивность ферментов оказывал экстракт травы дикорастущего цикория обыкновенного (при внесении его в инкубационную среду скорость ГР-реакции увеличивалась на 91 %, КАТ – на 37 % и iNOS снижалась на 24 % от контроля). Это может быть связано с наличием в составе травы цикория комплекса БАС (гидроксикоричные кислоты), которые по литературным данным обладают противовоспалительной активностью и перспективны при лечении прогрессирующего алкогольного стеатогепатита [125].



**Рисунок 34** – Результаты оценки субстанций из дикорастущего и культивируемого сырья цикория обыкновенного с использованием вторичной СФБТС на основе ГР, КАТ и iNOS

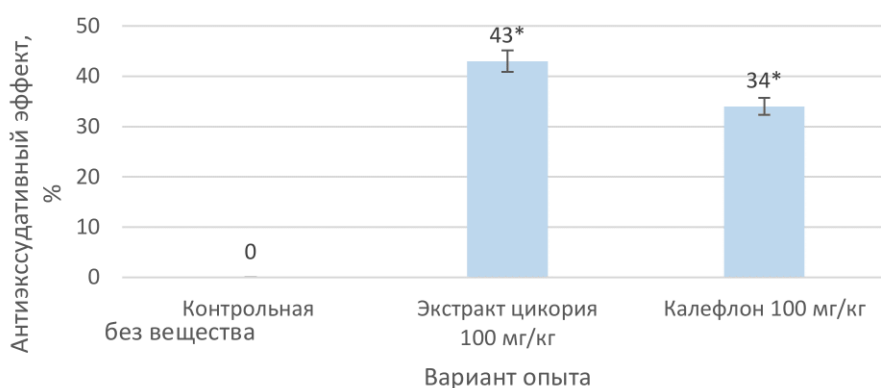
По результатам **молекулярного докинга** основных БАС исследуемых экстрактов в активный сайт КАТ, ГР и iNOS установлено, что наиболее активной по энергии связывания с КАТ оказалась цикориевая кислота (-9,1 ккал/моль), для цикориина был обнаружен вторичный сайт связывания с ферментом другим набором аминокислот. Высокую энергию связывания с ключевой аминокислотой активного центра ГР cys58 показали эскулетин и цикориин. При исследовании взаимодействий ведущих БАС выявлено, что они все кроме эскулетина взаимодействуют с гемом в составе iNOS. Среди изученных БАС наибольшую энергию связывания с iNOS показали хлорогеновая и цикориевая кислоты: -9,6 и -9,9 ккал/моль, соответственно.

Полученные с помощью СФБТС результаты (выбрана субстанция из травы дикорастущего сырья, так как ее влияние на активность ферментов *in vitro* было

наибольшим) согласуются с результатами с использованием биотест-систем организменного уровня на модели формалинового и карагенинового отеков в соответствии с [86] на крысах *Wistar* обоего пола с исходной массой тела 200,0–220,0 г.

### 1. Модель формалинового отека

Выраженность отека оценивали через 24 часа онкометрическим методом по изменению объема лапки. Оценку антиэкссудативного эффекта проводили с использованием формулы 7. Полученные данные представлены на Рисунке 35.



**Рисунок 35** – Результаты влияния экстракта травы цикория на степень экссудации на модели формалинового отека у крыс

Результаты исследования показали (Рисунок 34), что исследуемый экстракт цикория в дозе 100 мг/кг угнетал отек лапы крыс на 43 % по сравнению с контрольной группой. У животных, получавших калефлон, отмечалось снижение величины формалинового отека на 34 % по сравнению с контролем. Таким образом, субстанция из травы цикория в условиях модели формалинового отека оказывала достоверно выраженное противовоспалительное действие.

### 2. Модель карагенинового отека

Острое асептическое воспаление воспроизводили путем субплантарного введения в заднюю правую конечность крысы 0,1 мл 1%-го раствора каррагенина [86]. Экстракт травы цикория вводили животным *per os* в течение 7 дней и за 1 час до введения флогогенного агента. Через 3 часа после индукции воспаления оценивали выраженность воспалительной реакции онкометрическим методом по изменению объема лапы. Оценку антиэкссудативного эффекта проводили с использованием формулы (7) [87].



Результаты исследования представлены на Рисунке 36.



**Рисунок 36** – Результаты влияния экстракта цикория на степень экссудации на модели карагенинового отека у крыс

Как видно из результатов, представленных на Рисунке 36, введение животным экстракта в дозе 100 мг/кг способствовало уменьшению отека на 37 % по сравнению с показателем в контрольной группе животных.

Таким образом, в условиях двух моделей острого экссудативного воспаления установлено, что предварительное введение субстанции из травы цикория обыкновенного препятствует развитию формалинового и карагенинового отеков конечности крыс; действие сопоставимо с эффектом препарата сравнения.

#### *Подтверждение антиоксидантной активности*

Антиоксидантную активность экстракта травы цикория обыкновенного изучали на модели перекисного и осмотического гемолиза с 1%-й суспензией эритроцитов донорской крови (Er/m). Препарат сравнения – аскорбиновая кислота. Образцы исследовали спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Антиоксидантное действие объектов исследования оценивали в процентах по отношению к контролю (внесение в реакционную среду додецилсульфата натрия) [52].

Результаты проведенных исследований представлены в Таблице 29.

Внесение экстракта в инкубационную среду приводило к снижению интенсивности ОН-опосредованного окисления плазматической мембраны эритроцитов. При этом повышение концентрации экстракта в инкубационной среде до 121 мкг/мл сопровождалось увеличению мембраностабилизирующей активности.

Повышение концентрации экстракта свыше 600 мкг/мл вызывало разрушение плазматической мембраны эритроцитов, с последующей денатурацией гемопротейна [52]. Установлено, что концентрация экстракта, вызывающая 50 % 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).

**Таблица 29** – Мембраностабилизирующая активность экстракта *in vitro*

| Вариант опыта                  | Концентрация экстракта, мкг/мл | Перекисный гемолиз, % | Осмотический гемолиз, % |
|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Опыт (Ег/м + экстракт цикория) | 121,0                          | 9,42±0,72             | 2,12±0,12               |
|                                | 12,1                           | 34,10±3,04            | 11,74±1,04              |
|                                | 1,2                            | 45,75±3,15            | 20,13±1,11              |
|                                | 0,12                           | 48,12±2,42            | 39,71±2,10              |
|                                | 0,012                          | 71,05±5,11            | 52,17±4,15              |
|                                | $IC_{50}$ , мкг/мл             | 0,11±0,010            | 0,042±0,003             |
| Аскорбиновая кислота           | 0,5                            | 27,89±1,12            | 10,57±0,43              |
|                                | 0,1                            | 34,85±1,20            | 14,38±0,35              |
|                                | 0,01                           | 48,86±2,31            | 24,80±1,10              |
|                                | 0,001                          | 56,56±2,17            | 50,60±2,02              |
|                                | 0,0002                         | 67,70±2,42            | 55,49±2,18              |
|                                | $IC_{50}$ , мкг/мл             | 0,009±0,0003          | 0,002±0,0001            |

Таким образом, подтверждено, что субстанция из травы цикория обыкновенного обладает выраженной антиоксидантной активностью. Вероятно, что указанный эффект обусловлен содержанием комплекса БАС, участвующего в образовании феноксильных радикалов, хелатированию ионов металлов переменной валентности, связыванию ОН и О<sub>2</sub> молекул; способствующего стабилизации и восстановлению структурно-функциональной целостности плазматической мембраны [52], что также подтверждено литературными данными [153].

Основываясь на данных, полученных с применением СФБТС на основе ГР, КАТ и iNOS выявлена антиоксидантная и противовоспалительная активность субстанции из травы цикория обыкновенного, что так же было продемонстрировано с использованием биотест-систем организменного уровня.

### 7.1.2 Испытания вторичной СФБТС на основе цитохрома P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазы

Для оценки антитоксических свойств БАС надземной части дикорастущего и культивируемого цикория обыкновенного использовали вторичную СФБТС на основе ключевых ферментов системы биотрансформации-детоксикации: цитохрома P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазы [69]. В качестве препарата сравнения использовали Силимар® (Россия), известный гепатопротектор растительного происхождения. Результаты изучения прямого влияния БАС надземной части культивируемого и дикорастущего цикория обыкновенного на монооксигеназную активность цитP<sub>450</sub>, а также ГТФ представлены в Таблице 29.

**Таблица 29** – Результаты изучения влияния цикория обыкновенного надземной части экстрактов сухих на монооксигеназную активность цитP<sub>450</sub> и ГТФ, *in vitro*

| Вариант опыта                                | Скорость реакций, цитохром P <sub>450</sub> , М±m |     |                    |     | Скорость реакций, глутатионтрансфераза, М±m |     |
|--|---|-----|--------------------|-----|---|-----|
|  | Анилингидроксилаза                                |     | Деметилаза         |     | нмоль/мин·мг белка                          |     |
|  | нмоль/мин·мг белка                                | %   | нмоль/мин·мг белка | %   | нмоль/мин·мг белка                          | %   |
| Контроль                                     | 4,48±0,28   | 100 | 4,98±0,29          | 100 | 167,7±0,64                                  | 100 |
| Цикория обыкновенного листьев экстракт сухой | 5,14±0,35   | 103 | 5,14±0,52          | 107 | 188,9±0,46                                  | 105 |
| Цикория обыкновенного травы экстракт сухой   | 5,47±0,37*  | 131 | 6,11±0,59*         | 158 | 251,4±0,34*                                 | 150 |
| Силимар®                                     | 5,95±0,46*  | 142 | 5,47±0,48*         | 142 | 220,1±0,32*                                 | 131 |

Как видно из Таблицы 29, БАС травы цикория обыкновенного при добавлении в инкубационную среду (*in vitro*) вызывал более выраженное, чем при добавлении субстанции из культивируемого сырья, увеличение скорости анилингидроксилазной реакции цитохрома P<sub>450</sub> на 31 % и деметилазной реакции на 58 % соответственно. Представленные результаты свидетельствуют о том, что трава дикорастущего цикория обыкновенного содержит БАС, оказывающие непосредственное активирующее влияние на оба активных центра цитP<sub>450</sub>, что указывает на ускорение метаболизма широкого круга соединений, подвергающихся превращению с участием цитP<sub>450</sub>. Кроме того, БАС травы дикорастущего сырья обладали наибольшим активирующим влиянием на глутатионтрансферазу, увеличивая скорость реакции

на 50 % по сравнению с контролем. Данный фермент катализирует второй этап биотрансформации, превращая органические альдегиды и перекиси липидов в нетоксичные продукты путем конъюгации с глутатионом. Таким образом, экстракт травы дикорастущего растения непосредственно активирует оба фермента, что может служить важным фактором его антитоксического действия.

Полученные с помощью СФБТС результаты согласовывали с результатами с использованием биотест-систем организменного уровня на модели тетрахлорметанового гепатита и литературными данными [195; 196; 198].

*1. Сухой экстракт листьев цикория обыкновенного (культивируемое сырьё)*

Изучали активность индикаторных ферментов цитолитического синдрома (АЛТ, АСТ), экскреционного фермента маркера холестаза – щелочной фосфатазы (ЩФ), а также содержание общего билирубина в условиях экспериментального тетрахлорметанового гепатита (Таблица 30), данные подтверждали гистологическими исследованиями (Рисунки 36–38).

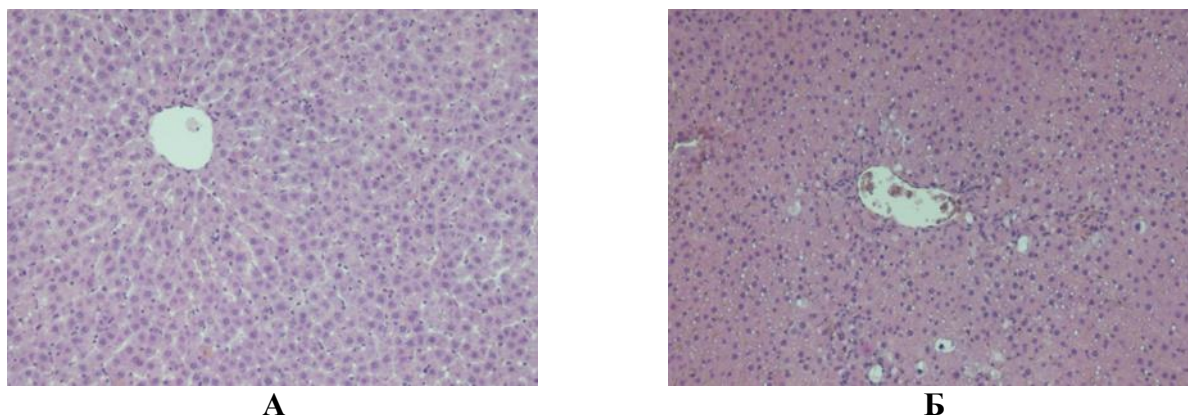
**Таблица 30** – Результаты влияния объектов исследования на активность ферментов-маркеров морфофункционального состояния гепатоцитов в сыворотке крови крыс на модели  $CCl_4$  гепатита

| Группа животных, n = 10                                 | Холестерин<br>ммоль/л | Глюкоза<br>ммоль/л | Билирубин<br>общ. мкмоль/л | ЩФ<br>Е/л        | АЛТ<br>Е/л       | АСТ<br>Е/л       |
|---|-----------------------|--------------------|----------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Интактные   | 1,72<br>±0,15         | 7,85<br>±0,63      | 2,12<br>±0,03              | 400,0<br>±6,97   | 54,03<br>±0,81   | 94,14<br>±6,51   |
| Контроль  | 0,99<br>±0,02         | 6,65<br>±0,27      | 2,89<br>±0,57              | 582,6<br>±19,27  | 113,51<br>±17,75 | 173,17<br>±2,10  |
| Цикория обыкновенного листьев экстракт сухой, 100 мг/кг | 1,14<br>±0,07*        | 6,75<br>±0,04*     | 2,69<br>±0,04*             | 543,8<br>±13,22* | 104,75<br>±1,08* | 164,50<br>±3,40* |
| Цикория обыкновенного листьев экстракт сухой, 500 мг/кг | 1,38<br>±0,03*        | 6,83<br>±0,16*     | 2,66<br>±0,04*             | 486,5<br>±4,26*  | 102,63<br>±1,17* | 164,80<br>±1,33* |
| Силимар, 100 мг/кг                                      | 1,23<br>±0,06*        | 6,82<br>±0,13*     | 2,46<br>±0,09*             | 470,6<br>±7,87*  | 94,39<br>±1,17*  | 139,22<br>±2,11* |

Введение лабораторным животным тетрахлорметана вызывало выраженные изменения активности индикаторных ферментов цитолитического синдрома (АЛТ, АСТ), экскреционного фермента маркера холестаза – щелочной фосфатазы, общего билирубина. Наблюдалось существенное увеличение активности этих ферментов-маркеров функционального состояния печени. Введение крысам субстанции из 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. При этом препарат сравнения Силимар® в дозе 100 мг/кг оказывал выраженное гепатопротективное действие, снижая активность ферментов-маркеров морфофункционального состояния гепатоцитов.

Морфологическое строение образцов печени, полученной от крыс интактной группы I, соответствовало гистологической норме (Рисунок 37А). Введение тетрахлорметана вызывало дистрофические изменения по типу гиалиново-капельной дистрофии (Рисунок 37Б).



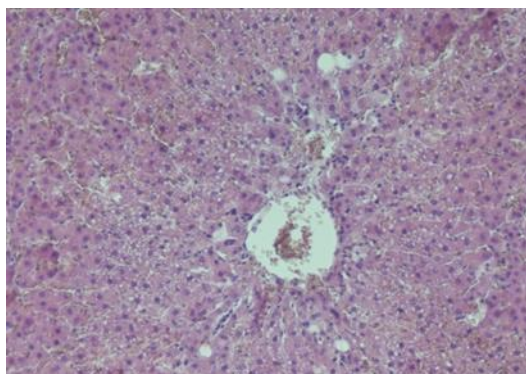
**Рисунок 37** – Морфологическое строение печени интактных крыс (А) и крыс с  $CCl_4$  гепатитом (Б). Здесь и далее препараты окрашивали гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 100$

Таким образом, оценивая морфологическую структуру органов крыс-самцов, видно, что тетрахлорметан оказывает выраженное общетоксическое действие на печень лабораторных животных.

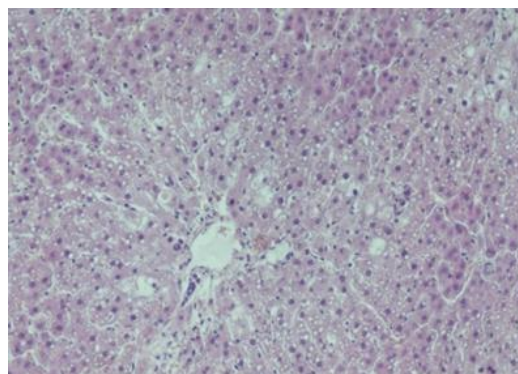
Введение цикория обыкновенного листьев экстракта сухого в дозах 100 мг/кг (Рисунок 38А) и 500 мг/кг (Рисунок 38Б) практически не оказывал влияния на состояние гепатоцитов.

На Рисунке 37 А, Б видно, что при введении экстракта в дозе 100 мг/кг наблюдались изменения по типу гиалиново-капельной и жировой дистрофии.

В печени крыс V группы, получавших Силимар® (100 мг/кг) выявлены дистрофические изменения гепатоцитов (Рисунок 39).

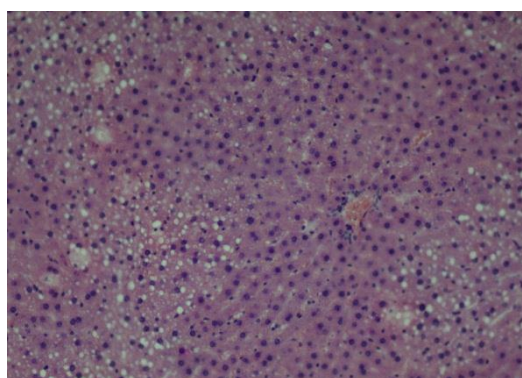


А



Б

**Рисунок 38** – Морфологическое строение печени крыс, получавших цикория обыкновенного листьев экстракт сухой в дозах 100 мг/кг (А) и 500 мг/кг (Б), модель  $CCl_4$  гепатита



**Рисунок 39** – Морфологическое строение печени крыс, получавших Силимар® в дозе 100 мг/кг, модель  $CCl_4$  гепатита

Оценивая морфологическую структуру печени крыс V группы, установлено, что Силимар® в дозе 100 мг/кг проявлял гепатопротективную активность.

Таким образом, с применением патогистологических и биохимических методов показана достоверность и приемлемость применения СФБТС – сухой экстракт листьев цикория обыкновенного проявлял незначительное гепатопротективное действие и не рекомендуется в качестве субстанции для разработки на ее основе лекарственного препарата гепатопротекторного действия.

## 2. Сухой экстракт травы цикория обыкновенного (дикорастущее сырьё)

Выявленные с помощью СФБТС в опытах *in vitro* гепатопротективные свойства экстракта из дикорастущего сырья подтверждали в фармакологических экспериментах на модели токсического гепатита, индуцированного тетрахлорметаном ( $CCl_4$ ), на 50 нелинейных крысах-самцах с исходной массой тела 200,0–220,0 г.

Результаты изучения влияния субстанции из дикорастущего сырья на активность маркеров морфофункционального состояния гепатоцитов в сыворотке крови крыс представлены в Таблице 31.

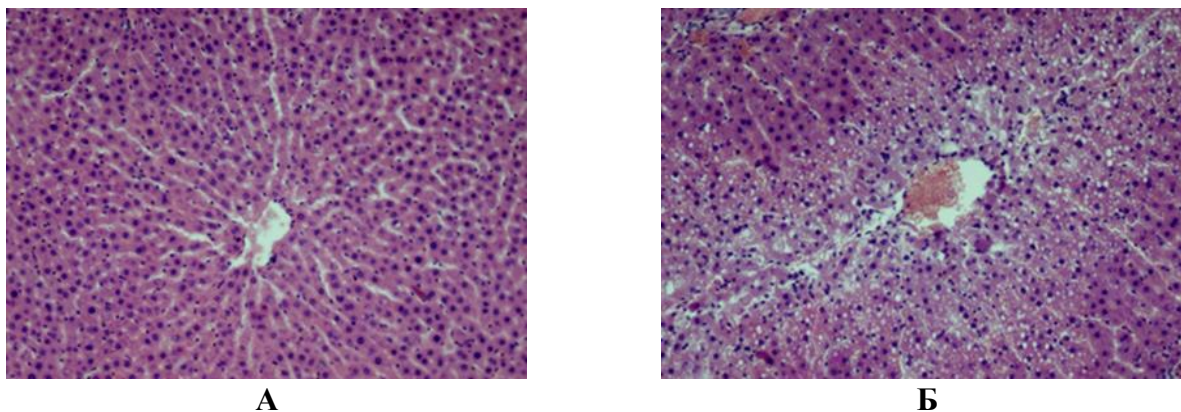
**Таблица 31** – Биохимические показатели крови крыс, получавших экстракт и препарат сравнения Силимар® ( $M \pm m$ ),  $n = 10$

| АЛТ, Е/л  | %   | АСТ, Е/л     | %   | ЩФ, Е/л      | %   | Билирубин. общ. мкмоль/л | %    |
|---|-----|--------------|-----|--------------|-----|--------------------------|------|
| I. Интактные  |     |              |     |              |     |                          |      |
| 64,06±5,45  | –   | 89,58±6,42   | –   | 321,00±6,80  | –   | 1,30±0,12                | –    |
| II. Контроль (модель тетрахлорметанового гепатита)                  |     |              |     |              |     |                          |      |
| 202,60±5,42   | 100 | 189,60±3,91  | 100 | 569,00±5,50  | 100 | 1,94±0,04*               | 100  |
| III. Экстракт, доза 100 мг/кг + модель тетрахлорметанового гепатита |     |              |     |              |     |                          |      |
| 131,70±1,63*  | 65  | 160,40±4,10* | 85  | 483,70±4,90* | 85  | 1,62±0,10                | 80   |
| IV. Экстракт, 500 мг/кг + модель тетрахлорметанового гепатита       |     |              |     |              |     |                          |      |
| 111,40±4,00*  | 55  | 136,50±2,67* | 72  | 449,50±4,51* | 79  | 1,36±0,06*               | 71   |
| V. Силимар®, 100 мг/кг + модель тетрахлорметанового гепатита        |     |              |     |              |     |                          |      |
| 135,80±6,60*  | 67  | 161,20±2,39* | 85  | 489,40±8,06* | 86  | 1,62±0,04*               | 83,5 |

Профилактическое введение экстракта в дозах 100 мг/кг и 500 мг/кг дозозависимо снижало активность АЛТ на 35 % и 45 % соответственно, АСТ на 15 % и 28 %, ЩФ на 15 % и 21 %; содержание общего билирубина – на 20 % и 29 % в сыворотке крови крыс по сравнению с аналогичными показателями у животных с нелеченым экспериментальным гепатитом II группы. Биохимические показатели крови крыс IV группы, получавших ЭТДЦ в дозе 500 мг/кг были ниже, чем у крыс V группы, которым вводили препарат сравнения Силимар®, 100 мг/кг.

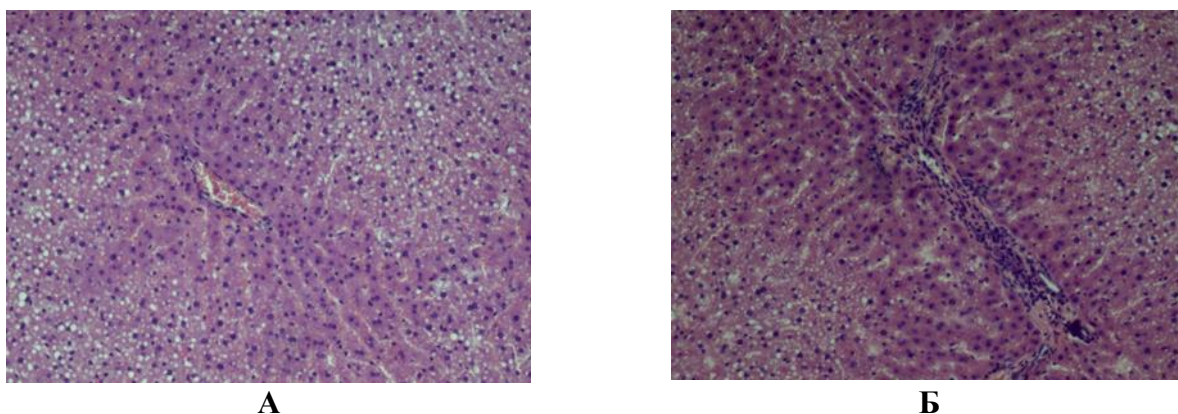
Морфологическое строение образцов печени, полученной от крыс интактной группы I, соответствовало гистологической норме. Введение тетрахлорметана вызывало дистрофические изменения по типу гиалиново-капельной дистрофии (Рисунок 40).





**Рисунок 40** – Морфологическое строение печени intactных крыс (А) и крыс с  $\text{CCl}_4$  гепатитом (Б). Здесь и далее препараты окрашивали гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 100$

Введение экстракта в дозах 100 и 500 мг/кг уменьшало дистрофические изменения гепатоцитов, при этом эффект был более выражен при введении максимальной дозы экстракта (Рисунок 41).



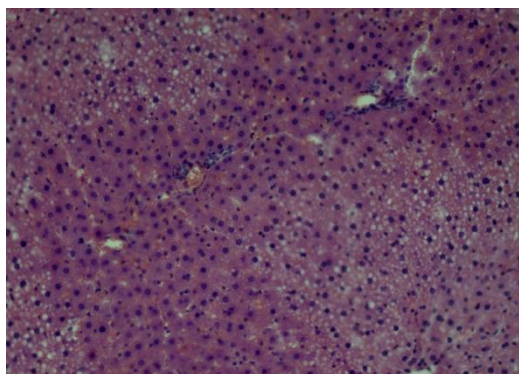
**Рисунок 41** – Морфологическое строение печени крыс, получавших экстракт в дозах 100 мг/кг (А) и 500 мг/кг (Б), модель  $\text{CCl}_4$  гепатита

В печени крыс V группы, получавших препарат сравнения Силимар® (100 мг/кг) выявлены аналогичные дистрофические изменения гепатоцитов, что и в группе III – экстракт в дозе 100 мг/кг (Рисунок 42).

Оценивая морфологическую структуру печени крыс III и IV групп, установлено, что Силимар® в дозе 100 мг/кг проявлял гепатопротективную активность.

На основании результатов патогистологических исследований показано, что субстанция в дозах 100 и 500 мг/кг проявлял дозозависимую гепатопротективную активность, сравнимую с аналогичным действием лекарственного препарата Силимар®.





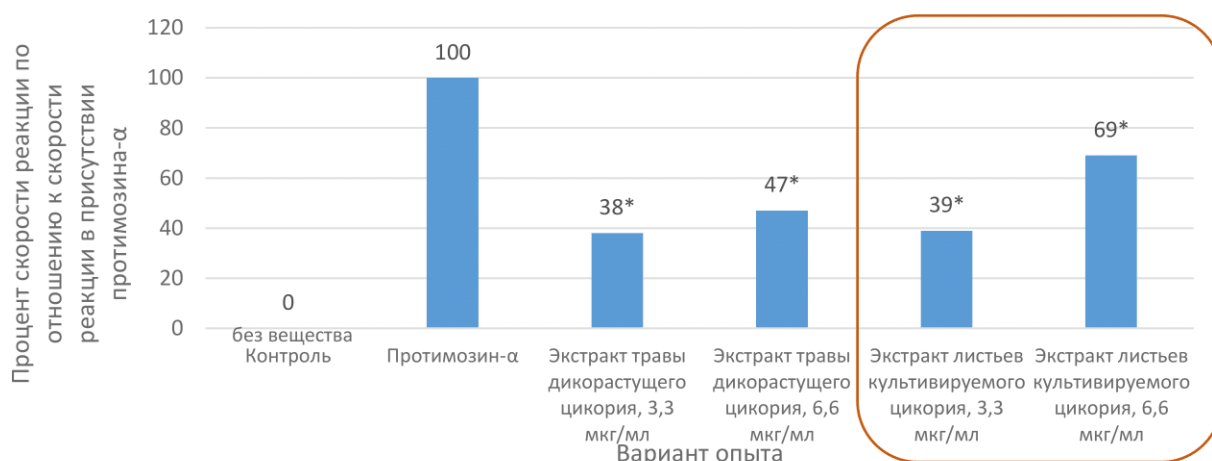
**Рисунок 42** – Морфологическое строение печени крыс, получавших Силимар® в дозе 100 мг/кг, модель  $\text{CCl}_4$  гепатита

Таким образом, в экспериментах *in vivo* было подтверждено, что субстанция из травы цикория обыкновенного обладает гепатопротективной активностью в условиях модели тетрахлорметанового гепатита, что подтверждается гистологическими исследованиями и согласуется с ранее полученными данными на модели острого токсического поражения печени крыс, вызванного однократным подкожным введением сулемы в дозе 3 мг/кг [123].

### ***7.1.3 Испытания первичной СФБТС на основе НАДФН-оксидазы***

Сравнительную оценку иммуномодулирующей активности экстрактов травы дикорастущего и листьев культивируемого растения целесообразно проводить с применением первичной СФБТС на основе НАДФН-оксидазы, ключевого фермента терминальной стадии фагоцитоза, респираторного взрыва. Результаты представлены на Рисунке 43.

Для сравнительной количественной оценки влияния изучаемых экстрактов на активность НАДФН-оксидазы *in vitro*, соотносили скорости реакций, полученные в пробах с изучаемыми объектами, со скоростью НАДФН-оксидазной реакции в пробе, содержащей известный природный иммуноактиватор протимозина- $\alpha$  (кислый белок, выделенный из тимуса крысы) [17], принимая ее за 100 %. Концентрация протимозина- $\alpha$  составляла 1 мкг/мл пробы [54].



**Рисунок 43** – Скорость НАДФН-оксидазной реакции *in vitro* (в %) в присутствии экстрактов цикория

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 [54]: НАДФН окислялся со скоростью 28,3 нмоль/мин на 10 мкл гомогената, что принимали за 100 %. При добавлении цикория обыкновенного травы экстракта сухого в инкубационную среду происходила активация НАДФН-оксидазы. При этом активация НАДФН-оксидазной реакции составила при концентрации экстракта 3,3 мкг/мл 38 % от эффекта протимозина-α, 6,6 мкг/мл – 47 %. Эффект цикория обыкновенного листьев экстракта сухого был более выраженным – при большей концентрации (6,6 мкг/мл), он увеличивал скорость НАДФН-оксидазной реакции на 69 % (Рисунок 43).

С использованием СФБТС на основе НАДФН-оксидазы в опытах *in vitro* установлены количественные различия двух экстрактов цикория обыкновенного (из дикорастущего и культивируемого сырья) по их влиянию на активность данного фермента: влияние субстанции из листьев было более выражено, чем влияние субстанции из травы цикория. В связи с чем экстракт, полученный из листьев культивируемого растения, является более перспективным источником БАС иммуномодулирующего действия.

Целесообразность использования НАДФН-оксидазной СФБТС была подтверждена на организменном уровне, на экспериментальных моделях с использо-

ванием лабораторных животных. Показана их эффективность по отношению к реакциям клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа при экспериментальном иммунодефиците [76; 90], при этом эффект БАС листьев цикория обыкновенного был выше, чем из травы дикорастущего растения.

Таким образом, результаты, полученные с помощью первичной НАДФН-оксидазной СФБТС для выявления иммуномодулирующих свойств различных БАС, были сопоставимы экспериментально с известными методами определения данного вида активности на лабораторных животных, указанными в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств [86].

Из литературных источников известно, что цикорий обыкновенный может вызывать иммунный ответ [297, 304]. Так, Kim J. H. и соавт. (2002) установили, что развитие вызванного спиртом этиловым иммунотоксического действия, значительно приостанавливается или предотвращается при введении спиртового экстракта *C. intybus* [206].

Karimi M. H. и соавт. (2014) изучали влияние спиртового экстракта корня цикория на иммунную систему путем воздействия на дендритные клетки мышей. Экстракт в более высоких концентрациях ингибировал пролиферацию аллогенных Т-клеток, а в более низких концентрациях изменял уровень цитокинов таким образом, что IL-4 снижался, а IFN-увеличивался [203]. Отечественными авторами было установлено, что гепатопротективные свойства экстракта корней данного растения выше, чем лекарственного препарата Карсил® [41].

Основываясь на полученных в опытах *in vitro* и *in vivo* данных, можно отметить комплексное воздействие обеих исследуемых субстанций на гепатобилиарную систему человека: они оказывали антиоксидантное, антитоксическое, противовоспалительное и иммуномодулирующее действие. Так, было показано, что механизм гепатопротективной активности некоторых растительных экстрактов, обусловлен антиоксидантным, противовоспалительным, антистеатотическим, антиаппототическим и антифибротическим действием фенольных соединений и терпеноидов, входящих в их состав [147].

## 7.2 Применение специфических ферментных биотест-систем для выявления целевых биологически активные соединений

Гепатопротективное действие субстанции из травы цикория обыкновенного (дикорастущее сырьё) обусловлено активностью содержащегося в нем комплекса БАС [240]. Поэтому для выявления целевых БАС в обеспечении данного действия проводили исследование биологической активности фракций веществ различной полярности, полученных фракционированием данного экстракта, с помощью СФБТС на основе цитохрома P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазы в условиях опытов *in vitro*, а затем полученные данные согласовывали с результатами, полученными с использованием организменных тест-систем на конкретных экспериментальных моделях (лабораторные животные).

Данные опытов *in vitro* представлены в Таблице 32.

**Таблица 32** – Результаты оценки фракций экстракта травы цикория обыкновенного с использованием вторичной СФБТС на основе цитP<sub>450</sub> и ГТФ

| Вариант опыта         | Скорость реакций, цитохром P <sub>450</sub> , M±m |     |                       |     | Скорость реакций, глутатионтрансфераза, M±m |     |
|-----------------------|---|-----|-----------------------|-----|---|-----|
|                       | Анилингидроксилаза                                |     | Деметилаза            |     | тионтрансфераза, M±m                        |     |
|                       | нмоль/мин<br>мг белка                             | %   | нмоль/мин<br>мг белка | %   | нмоль/мин<br>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 |

Из Таблицы 32 видно, что все фракции и препарат сравнения ускоряли реакции, катализируемые цитохромом P<sub>450</sub>. Однако, в большей степени скорость реакций увеличивалась в присутствии бутанольной и водной фракций и препарата Силимар®. Установлено, что введение бутанольной фракции в пробу приводило к увеличению скорости гидроксилирования и деметилирования на 87 и 103 %, соответственно, а водная фракция достоверно активировала реакции анилирования и гидроксилирования на 56 и 132 % соответственно. В тоже время активирующее

действие водной и бутанольной фракций на монооксигеназную систему цитохрома P<sub>450</sub> может свидетельствовать об их выраженных гепатопротективных свойствах, что требует подтверждения с использованием биотест-систем организменного уровня.

Влияние исследованных соединений на ключевой фермент 2-го этапа детоксикации – ГТФ также различается по увеличению скорости реакции в их присутствии. Так степень активации ГТФ уменьшается в ряду Силимар® > бутанольная фракция > водная фракция > этилацетатная фракция; БАС, содержащиеся в спиртовой фракции влияния на активность ГТФ не оказывали.

Из представленных в Таблице 32 данных видно, что водная и бутанольная фракции обладали наибольшим активирующим влиянием на ферменты биотрансформации-детоксикации цитP<sub>450</sub> и ГТФ в условиях опытов *in vitro*, что доказывает их важное фармакологическое свойство – детоксицирующую активность.

Для обоснования целесообразности использования СФБТС проводили исследования гепатопротективной активности на лабораторных животных.

На первом этапе изучали влияние экстракта и фракций экстракта травы цикория обыкновенного на активность ферментов первого и второго этапов системы биотрансформации и детоксикации ксенобиотиков в клетке: цитохрома P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазы в микросомальной фракции гомогената печени [26]. Данные представлены в Таблице 33.

**Таблица 33** – Результаты изучения влияния фракций цикория обыкновенного травы экстракта сухого на содержание цитP<sub>450</sub> и на активность ключевых ферментов биотрансформации в условиях модели CCl<sub>4</sub> гепатита у крыс (M±m)

| Вариант опыта, n=8                     | Содержание цитP <sub>450</sub><br>(нмоль/мг белка) | Гидроксилирование<br>анилина, нмоль<br>НАДФН/нмоль цит P <sub>450</sub> | Активность<br>ГТФ, нмоль про-<br>дукта/мг/мин |
|--|--|---|---|
| Интактные                              | 26,25±1,22   | 14,6±0,65   | 351,4±26,7                                    |
| Контрольные (CCl <sub>4</sub> гепатит) | 13,30±0,62 <sup>+</sup>                            | 4,9±0,43 <sup>+</sup>   | 153,4±15,2 <sup>+</sup>                       |
| Экстракт, 100 мг/кг                    | 22,13±1,05*  | 9,11±0,44*  | 450,5±21,9*                                   |
| Спиртовая фракция, 100 мг/кг           | 13,92±0,50*  | 7,9±0,87*   | 335,0±26,5*                                   |
| Этилацетатная фракция, 100 мг/кг       | 16,24±0,60*  | 6,9±0,50*   | 231,5±19,5*                                   |

Продолжение таблицы 33

| Вариант опыта, n=8               | Содержание цитР <sub>450</sub><br>(нмоль/мг белка) | Гидроксилирование<br>анилина, нмоль<br>НАДФН/нмоль цит Р <sub>450</sub> | Активность<br>ГТФ, нмоль про-<br>дукта/мг/мин |
|----------------------------------|--|---|---|
| Бутанольная фракция, 100 мг/кг   | 18,36±0,60*  | 8,7±0,80*   | 320,9±27,6*                                   |
| Водная фракция, 100 мг/кг        | 20,71±1,34*  | 8,9±0,65*   | 473,5±28,5*                                   |
| Силимар <sup>®</sup> , 100 мг/кг | 23,62±1,25*  | 12,0±1,43*  | 381,2±22,9*                                   |

*Примечание* – Далее и везде – <sup>+</sup> статистическая значимость различий в сравнении с интактным контролем, p < 0,05; \* – относительно модели гепатита, p < 0,05

Приведенные в Таблице 33 данные исследования показали, что в микросомах печени контрольных крыс (модель ССl<sub>4</sub> гепатита без лечения) по сравнению с интактными животными происходило уменьшение содержания цитР<sub>450</sub> (на 50,7 %), что подтверждает токсическое воздействие ССl<sub>4</sub> на печень крыс.

При предварительном 5-кратном введении экстракта, фракций экстракта и препарата сравнения содержание цитР<sub>450</sub> в микросомах увеличивалось по сравнению с животными контрольной группы (модель гепатита). При этом анилингидроксилазная активность цитР<sub>450</sub> достоверно повышалась по сравнению с контрольными животными при введении в дозе 100 мг/кг экстракта – в 1,8 раз; при введении фракций: спиртовой – в 1,6 раз, этилацетатной – в 1,4 раза, бутанольной – в 1,7 раз, водной – в 1,8 раз; при введении препарата сравнения – в 2,4 раза, что свидетельствует об их детоксицирующей активности, являющейся важным аспектом гепатопротективного действия.

Активность глутатионтрансферазы в микросомах печени крыс с токсическим гепатитом была в 2,3 раза ниже, чем у интактных. При введении экстракта и фракций активность ключевого фермента второго этапа биотрансформации при токсическом повреждении печени ССl<sub>4</sub> возрастала. Так степень активации ГТФ увеличивалась в ряду: этилацетатная < бутанольная < спиртовая < Силимар<sup>®</sup> < экстракт < водная фракция.

Стоит отметить, что предварительное 5-кратное введение экстракта, водной фракции и препарата сравнения приводило к увеличению содержания цитР<sub>450</sub> и активности ферментов цитР<sub>450</sub> и ГТФ практически до уровня этих же показателей у интактных животных.

При моделировании токсического поражения печени с введением животным  $CCl_4$  были зафиксированы выраженные изменения активности ферментов-маркеров функционального состояния печени (Таблица 34). Наблюдалось увеличение активности АСТ (в 1,5 раза;  $p < 0,05$ ) и АЛТ (в 2 раза;  $p < 0,05$ ), а показатель активности ЩФ сыворотки крови превысил данные, полученные для интактных животных в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ).

**Таблица 34** – Результаты изучения влияния фракций экстракта травы цикория обыкновенного на активность ферментов-маркеров морфофункционального состояния гепатоцитов и содержание глюкозы и холестерина в сыворотке крови крыс с интоксикацией  $CCl_4$  ( $M \pm m$ )

| Группы крыс,<br>n = 8             | АСТ, Е/л                | АЛТ, Е/л               | ЩФ, Е/л                | Билирубин общ,<br>мкмоль/л | Глюкоза,<br>ммоль/л   | Холестерин,<br>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 ( $CCl_4$<br>гепатит) | 143,9±12,0 <sup>+</sup> | 111,0±6,4 <sup>+</sup> | 545,6±8,1 <sup>+</sup> | 2,8±0,03 <sup>+</sup>      | 4,4±0,08 <sup>+</sup> | 0,66±0,07 <sup>+</sup> |
| 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 <sup>®</sup> , 100 мг/кг  | 113,70±3,9*             | 65,5±1,2*              | 479,0±8,8*             | 2,34±0,08*                 | 4,88±0,03*            | 0,92±0,04*             |

Введение опытным животным  $CCl_4$  вызывало у них существенные нарушения метаболических процессов (Таблица 34). Изменения углеводного и липидного обмена проявлялись в снижении уровня глюкозы (на 17,3 %;  $p < 0,05$ ) и холестерина (на 64,9 %,  $p < 0,05$ ) в крови крыс по сравнению с интактными животными.

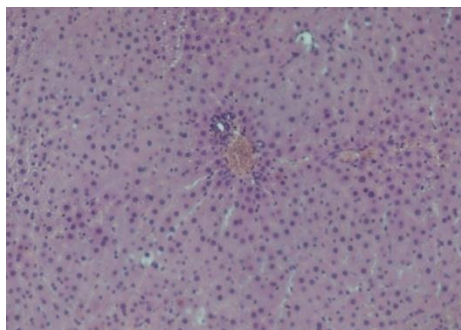
Как видно из результатов, представленных в Таблице 34, профилактическое 5-кратное введение в организм крыс с токсическим поражением печени фракций цикория обыкновенного травы экстракта сухого вызывало снижение активности АСТ, АЛТ и ЩФ. Наибольшим гепатопротективным действием на активность ферментов-маркеров функционального состояния печени крыс обладали Силимар<sup>®</sup> (снижает активность АСТ – на 15 %, АЛТ – на 33 % и ЩФ – на 14 %,  $p < 0,05$ ), водная (на 20,5 %, 40,9 % и 11,8 % соответственно;  $p < 0,05$ ) и бутанольная (на

18,2 %, 33,2 % и 17,1 % соответственно;  $p < 0,05$ ) фракции. Несмотря на достоверное уменьшение гиперферментемии, обнаруженной в группах животных, получавших фракции цикория обыкновенного травы экстракта сухого, активность АСТ, АЛТ и ЩФ не достигала их содержания в крови интактной группы. Установленное влияние фракций на активность ферментов-маркеров функционального состояния печени крыс согласуется с полученными ранее результатами для цикория обыкновенного травы экстракта сухого.

Гипогликемия у крыс с интоксикацией  $CCl_4$ , возможно, связана с нарушением процессов гликогенолиза и глюконеогенеза в печени [21]. У крыс с интоксикацией  $CCl_4$ , получавших фракции цикория обыкновенного травы экстракта сухого, отмечен рост концентрации глюкозы и холестерина. Наибольшим влиянием, сопоставимым с влиянием препарата сравнения, обладали водная (содержание глюкозы увеличивалось на 10,2 %, холестерина – на 28,8 %;  $p < 0,05$ ), и бутанольная (на 16,2 % и 16,7 %, соответственно;  $p < 0,05$ ) фракции.

Из результатов, представленных выше, видно, что максимальным гепатопротективным эффектом обладали водная и бутанольная фракции цикория обыкновенного травы экстракта сухого в условиях модели тетрахлорметанового гепатита. Полученные данные подтверждали патогистологическими исследованиями (Рисунки 39, 40).

Введение водной фракции цикория обыкновенного травы экстракта сухого в дозе 100 мг/кг уменьшало дистрофические изменения гепатоцитов (Рисунок 44).

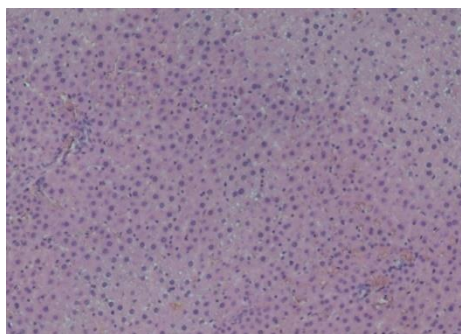


**Рисунок 44** – Морфологическое строение печени крыс, получавших водную фракцию цикория обыкновенного травы экстракта сухого в дозах 100 мг/кг, модель  $CCl_4$  гепатита



Проводя оценку морфологической структуры печени крыс-самцов (Рисунок 43), можно сделать заключение, что водная фракция в дозе 100 мг/кг обладает выраженным гепатопротективным действием на печень лабораторных животных.

При введении же крысам бутанольной фракции экстракта в дозе 100 мг/кг в гепатоцитах наблюдались изменения по типу гиалиново-капельной и жировой дистрофии (Рисунок 45).



**Рисунок 45** – Морфологическое строение печени крыс, получавших бутанольную фракцию цикория обыкновенного травы экстракта сухого в дозах 100 мг/кг, модель  $CCl_4$  гепатита

Основываясь на морфологическом строении печени крыс, получавших бутанольную фракцию (Рисунок 45), можно сделать заключение, что она обладает слабовыраженным гепатопротективным действием.

Таким образом, суммируя все полученные экспериментальные данные, можно сделать вывод, что наибольшим гепатопротективным действием обладала водная фракция экстракта травы цикория обыкновенного. Данная фракция содержит в преобладающем количестве цикориевую и хлорогеновую кислоты, что может свидетельствовать о доминирующей роли данных соединений в гепатопротективном эффекте водной фракций, а также суммарного экстракта в целом, что подтверждено литературными данными.

Так, по мнению зарубежных авторов в основе механизма защитного действия данных соединений лежит их антиоксидантная [210; 226; 266; 306] и противовоспалительная активность [324].

В эксперименте на модели стеатоза печени, вызванного спиртом этиловым также было показано, что цикориевая кислота при пероральном введении в дозе

4 мг/кг способно ослаблять острый алкогольный стеатоз у мышей, препятствуя индукции индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и iNOS-зависимых сигнальных каскадов в печени [215].

В недавних исследованиях Hussein O. E. и соавт. (2020) установили защитное действие цикориевой кислоты при токсическом действии на печень, вызванном введением животным метотрексата, путем ослабления окислительного стресса и воспаления [191].

### 7.3 Изучение возможности связывания биологически активных соединений с активными центрами ферментов

Из общего перечня видов биологической активности, полученного в Программе PASS, был проведен отбор механизмов действия и фармакологических эффектов, ассоциированных с гепатопротективным действием. Отбор активностей проводился с учетом информации, содержащейся в базе знаний PharmaExpert [49], и данных лабораторных экспериментов. Перечень отобранных активностей и значения инвариантной точности прогноза (IAP) [27] представлены в Таблице 35.

**Таблица 35** – Перечень видов активности PASS Refined2022, ассоциированных с гепатопротективным эффектом, значения точности прогноза (IAP) и количество активных соединений в обучающей выборке

| <i>Количество активных соединений</i> | <i>IAP</i> | <i>Название биологической активности</i> |
|---------------------------------------|------------|--|
| 512                                   | 0,90       | СYP1A2 субстрат                          |
| 234                                   | 0,98       | СYP2A6 ингибитор                         |
| 150                                   | 0,92       | СYP2B6 ингибитор                         |
| 3598                                  | 0,87       | СYP2C19 ингибитор                        |
| 4148                                  | 0,87       | СYP2C9 ингибитор                         |
| 390                                   | 0,88       | СYP2C9 субстрат                          |
| 4581                                  | 0,90       | СYP2D6 субстрат                          |
| 483                                   | 0,90       | СYP2D6 субстрат                          |
| 8715                                  | 0,89       | СYP3A4 ингибитор                         |
| 950                                   | 0,88       | СYP3A4 субстрат                          |
| 273                                   | 0,97       | Ингибитор глутатион S-трансферазы        |

## Продолжение таблицы 35

| <i>Количество активных соединений</i> | <i>IAP</i> | <i>Название биологической активности</i>                          |
|---------------------------------------|------------|---|
| 237                                   | 0,96       | Субстрат глутатион S-трансферазы                                  |
| 1436                                  | 0,91       | CYP1A2 ингибитор  |
| 1031                                  | 0,93       | Гепатопротектор   |
| 15                                    | 0,99       | GST P1-1 субстрат   |
| 14                                    | 0,89       | GST A субстрат  |
| 799                                   | 0,96       | Хелатор   |
| 127                                   | 0,90       | Антагонист холестерина  |
| 2641                                  | 0,93       | Ловушка свободных радикалов                                       |
| 1031                                  | 0,93       | Гепатопротектор   |
| 196                                   | 0,97       | Муколитик   |
| 1179                                  | 0,98       | Донор оксида азота  |
| 3444                                  | 0,99       | Агонист гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисомы |

*Прогноз гепатопротективного эффекта и ассоциированных механизмов действия*

В результате анализа прогнозируемых в Программе PASS профилей биологической активности установлено, что гепатопротективный эффект прогнозируется для цикориевой и хлорогеновой кислот со значениями  $P_a - P_i$  равными 0,35 и 0,45, соответственно.

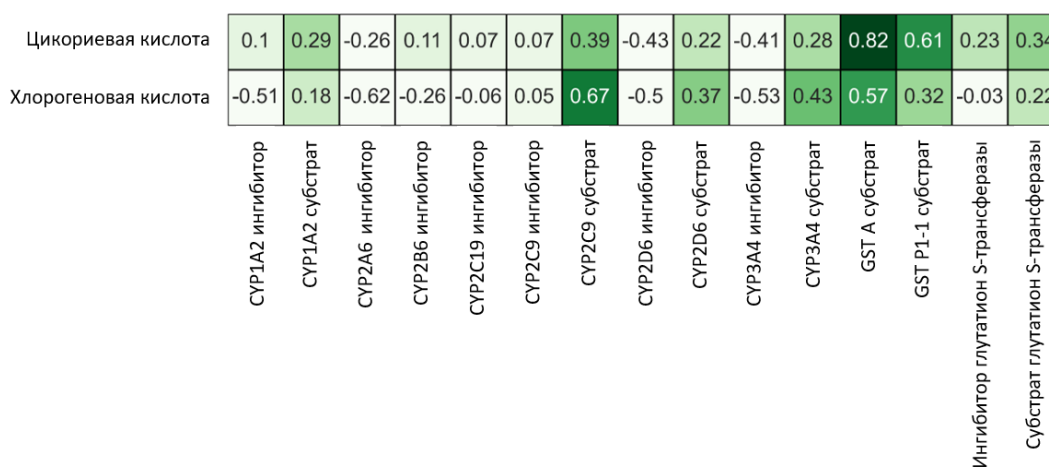
На основе данных PharmaExpert были установлены аддитивные/синергетические механизмы действия, связанные с проявлением гепатопротективного эффекта. Соответствующие сведения представлены в Таблице 36.

**Таблица 36** – Механизмы действия, ассоциированные с гепатопротективным эффектом

| Механизм действия   | Значение $P_a - P_i$ |                    |
|---|----------------------|--------------------|
|   | Хлорогеновая кислота | Цикориевая кислота |
| Хелатор   | 0,08                 | 0,29               |
| Антагонист холестерина  | 0,65                 | 0,67               |
| Муколитик   | 0,16                 | 0,19               |
| Агонист гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисомы | -0,05                | 0,33               |
| Донор оксида азота  | 0,05                 | 0,08               |
| Ловушка свободных радикалов                                       | 0,81                 | 0,68               |

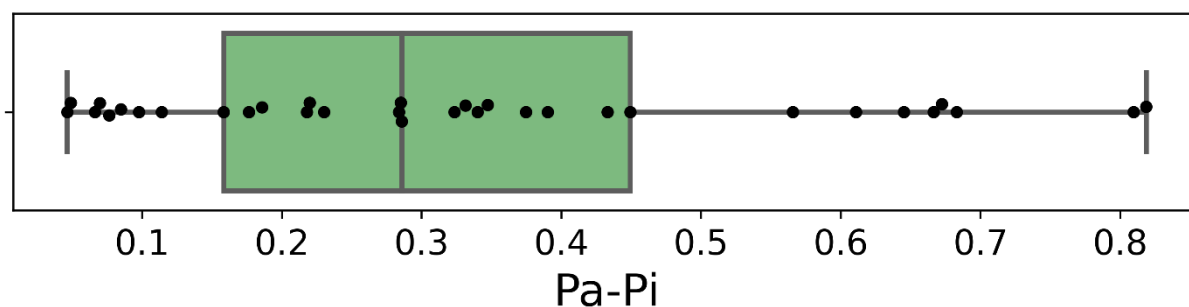
Как видно из Таблицы 36, при пороге  $P_a - P_i > 0,5$  прогнозируется два механизма действия ассоциированных с гепатопротективным эффектом. Антагонизм холестерина прогнозируется для цикориевой и хлорогеновой кислоты со значениями  $P_a - P_i$  равными 0,67 и 0,65, соответственно. Поглощение свободных радикалов прогнозируется со значениями  $P_a - P_i$  равными 0,81 и 0,68 для хлорогеновой и цикориевой кислот, соответственно. Значения  $P_a - P_i$ , полученные для остальных механизмов действия, порог  $P_a - P_i > 0,5$  не превышают.

Вероятностные оценки  $P_a - P_i$ , полученные для активностей, отобранных по результатам лабораторных исследований, хлорогеновой и цикориевой кислот, приведены на Рисунке 46.

**Рисунок 46** – Тепловая карта оценок  $P_a - P_i$ , рассчитанных для отобранных по результатам лабораторных экспериментов механизмов действия и исследуемых соединений

Как видно из Рисунка 46, для цикориевой и хлорогеновой кислот с оценками  $P_a - P_i > 0,5$  прогнозируется четыре механизма. Для цикориевой кислоты, при указанном пороге, прогнозируется взаимодействие с GST A (Глутатион-S-трансфераза A) и GST P1-1 (Глутатион-S-трансфераза A) в качестве субстрата, с оценками  $P_a - P_i$ , равными 0,82 и 0,61, соответственно. Для хлорогеновой кислоты прогнозируется взаимодействие с GST A и изоформой цитохрома  $P_{450} - CYP2C9$  в качестве субстрата, с оценками  $P_a - P_i$ , равными 0,57 и 0,67, соответственно.

Подводя итоги интерпретации анализа результатов оценки профилей биологической активности в Программе PASS, важно заметить, что большинство оценок  $P_a - P_i > 0$  для исследуемых соединений варьируют в диапазоне от 0,05 (хлорогеновая кислота – ингибитор CYP2C9) до 0,82 (цикориевая кислота – субстрат GST A). Соответствующие данные представлены на Рисунке 47.



**Рисунок 47** – Распределение положительных оценок  $P_a - P_i$ , полученных для исследуемых соединений и отобранных активностей

Как видно из Рисунка 46, две оценки  $P_a - P_i$  превышают порог 0,7, что может охарактеризовать данную группу, как соединения с высоким шансом подтверждения экспериментальной активности, но при этом данные соединения обладают высоким структурным сходством с соединениями обучающей выборки, имеющими соответствующие виды биологической активности. Шесть оценок  $P_a - P_i$  находятся в области  $0,5 < P_a - P_i < 0,7$ , что характеризует эти соединения, как имеющие меньшее структурное сходство с соединениями обучающей выборки и, соответственно, меньший шанс экспериментального обнаружения биологической активности. Наконец, 25 оценок  $P_a - P_i$  для анализируемых соединений имеют  $P_a - P_i < 0,5$ , что

уменьшает шансы на подтверждение биологической активности в эксперименте. Однако, в случае экспериментального подтверждения наличия прогнозируемой биологической активности, данное соединение может оказаться родоначальником нового химического класса (New Chemical Entity) в исследуемой фармакотерапевтической области [121].

В связи с чем, на следующем этапе работы мы оценивали цикориевую и хлорогеновую кислоты с использованием СФБТС на основе цитР<sub>450</sub> и ГТФ в условиях опытов *in vitro* (Таблица 37).

**Таблица 37** – Результаты оценки цикориевой и хлорогеновой кислот с использованием СФБТС на основе цитР<sub>450</sub> и ГТФ

| Вариант опыта        | Скорость реакций, цитохром Р <sub>450</sub> , 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±1,85                                  | 100 |
| Цикориевая кислота   | 4,74±0,40*  | 134 | 8,04±0,56*         | 164 | 409,7±2,36*                                 | 144 |
| Хлорогеновая кислота | 4,42±0,36*  | 125 | 14,15±1,0*         | 288 | 368,03±2,2*                                 | 129 |
| Силимар®             | 3,64±0,37*  | 103 | 5,73±0,23*         | 117 | 620,6±3,30*                                 | 218 |

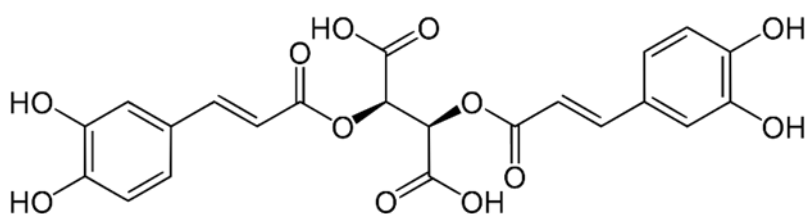
Из представленных результатов видно, что гидроксикоричные кислоты и Силимар® непосредственно активировали деметилазную и гидроксилазную активность цитР<sub>450</sub> и ГТФ. Однако, стоит отметить, что Силимар® более выразительно активировал ГТФ, что подтверждает его фармакологическую активность. Приведенные в Таблице 37 результаты показывают, что цикориевая и хлорогеновая кислоты обладают важным свойством – непосредственно активируют ключевой фермент системы биотрансформации – цитохром Р<sub>450</sub>, играющий ключевую роль в процессах детоксикации, которые происходят в печени и являются важным аспектом гепатопротективного действия.

Преимущество СФБТС заключается в том, что они позволяют выявлять возможные механизмы действия БАС, что важно при дальнейшем изучении эффективности и безопасности РЛС. Так, влияние гидроксикоричных кислот на активность

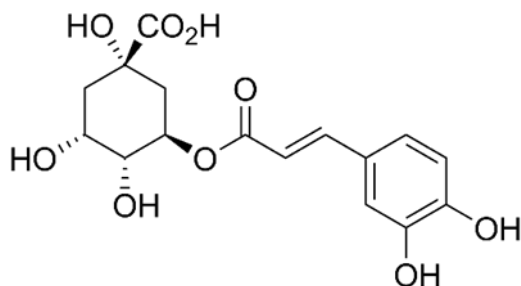
цитохрома P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазы свидетельствует об их связывании с данными ферментами, что раскрывает один из возможных механизмов действия данных соединений, входящих в состав экстракта травы цикория обыкновенного. В связи с чем, основываясь на данных Программы PASS, прогнозирующей для данных объектов роль субстратов для некоторых изоформ цитP<sub>450</sub>, нами был проведен для них молекулярный докинг в отношении цитохрома P<sub>450</sub> (изоформа CYP3A4) и глутатионтрансферазы (изоформа MGST1).

Несмотря на большое количество ферментов, непосредственно в метаболизме лекарственных средств участвуют не более 10 изоферментов цитохрома P<sub>450</sub>, при этом они биотрансформируют практически все известные лекарственные средства [92]. CYP3A4 является одним из самых распространенных ферментов первой фазы детоксикации и важным для фармацевтики, так как им биотрансформируется около 30 % всех клинически используемых лекарственных средств из практически всех терапевтических категорий [339]. Активный центр CYP3A4 самый объемный и поэтому может связывать и метаболизировать большое количество субстратов, в основном это липофильные вещества с достаточно объемной структурой [318, 291]. Микросомальная глутатионтрансфераза (MGST1) представляет собой мембрано-связанный фермент, способный детоксифицировать промежуточные реакционно-способные интермедиаты, включая метаболические электрофильные интермедиаты и липофильные гидроперекиси, благодаря своей глутатионзависимой трансферазной и пероксидазной активности [241, 279; 284].

Исследование взаимодействия с CYP3A4 проводили с использованием структуры 6UNJ из Protein Data Bank (PDB), представляющей собой комплекс гемопро-теина с лигандом (трет-бутил[(2R)-1-(нафталин-1-ил)-3-{{(2S)-1-оксо-3-фенил-1-{{2-(пиридин-3-ил)этил}амино} пропан-2-ил]сульфанил}пропан-2-ил]карбамат, соединение 3) [289], близким по размерам и топологии молекулы к исследуемым соединениям (Рисунок 48).



соединение 1



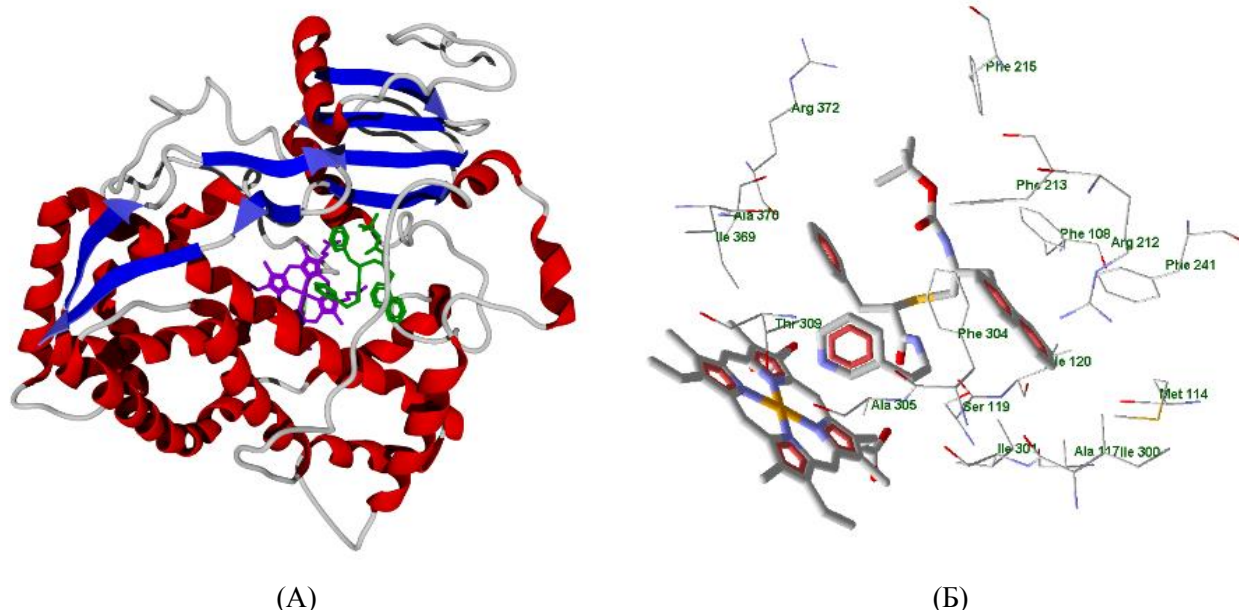
соединение 2

**Рисунок 48** – Структурные формулы цикориевой (соединение 1) и хлорогеновой (соединение 2) кислот

Структура 6UNJ является димерной и состоит из двух белковых макромолекул (цепей А и В), каждая из которых включает гемовую часть с центральным ионом  $\text{Fe}^{3+}$  и молекулу 3. Для моделирования использована подструктура, содержащая цепь А (Рисунок 49А). Сокристаллизованный лиганд 3 занимает полость фермента, смежную с гемовой частью цитохрома, и частично координируется с ионом  $\text{Fe}^{3+}$  за счет пиридинового атома азота (Рисунок 49Б); расстояние  $\text{Fe}\dots\text{N}$  составляет 2.82 Å.

Докинг соединений 1 и 2 с полным учетом конформационной подвижности лигандов и с жесткой биомишенью привел к наилучшим конформациям молекул 1 и 2 внутри сайта связывания СУР3А4, показанным на Рисунке 50.

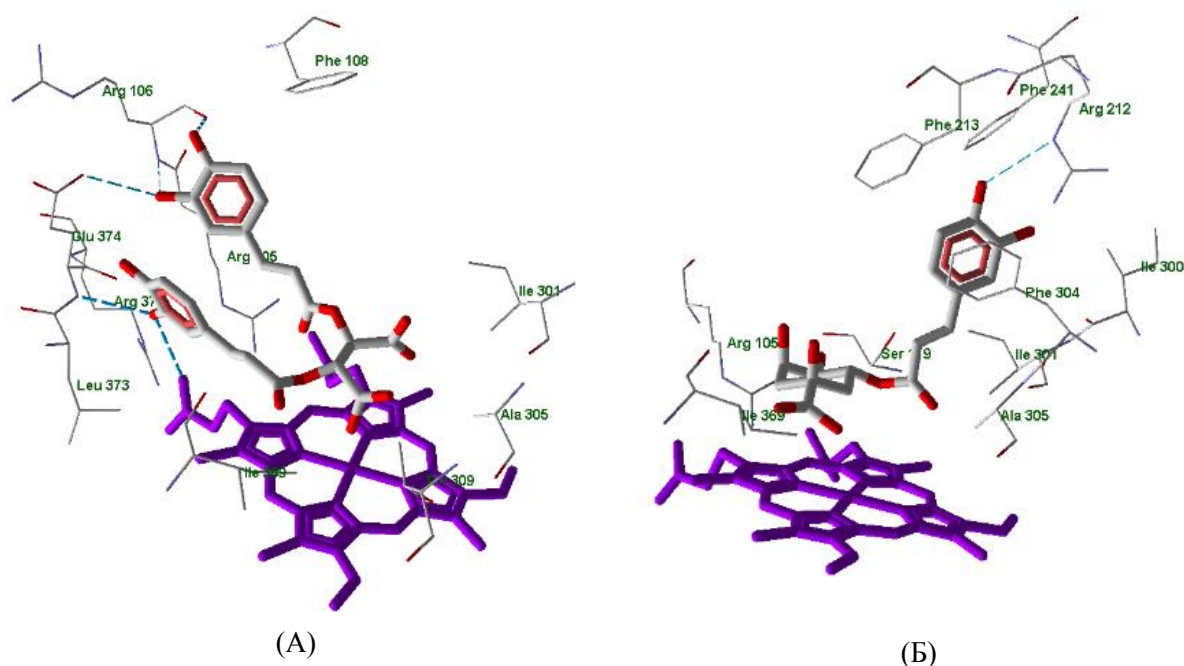




**Примечание** – (А): Общий вид цепи А вместе с гемовой частью (выделена сиреневым) и молекулой 3 (выделена зеленым). (Б): Расположение соединения 3 в сайте связывания СУР3А4. Показаны гемовая часть цитохрома и аминокислотные остатки в пределах 3 Å от молекулы 3

**Рисунок 49** – Строение изоформы СУР3А4 цитохрома Р<sub>450</sub> с сокристаллизованным лигандом 3 (PDB: 6UNJ) [289]

Цикориевая кислота (Рисунок 48, соединение 1) образует водородные связи с гемовой частью фермента и с остатком Glu374 за счет ОН группы в одном из бензольных колец лиганда, а также – при участии гидроксильных групп в другом бензольном кольце – с аминокислотными остатками Arg106 и Glu374 (Рисунок 50А). Кроме того, атом кислорода карбоксильной группы расположен вблизи иона Fe<sup>3+</sup> (расстояние Fe...О составляет 2.09 Å), что создает дополнительные возможности для закрепления молекулы 1 в сайте связывания). Частичная координация карбоксильной группы с ионом железа (III) гемопротейна имеет место и для хлорогеновой кислоты – в этом случае расстояние Fe...О, найденное по результатам докинга, равно 2.85 Å. Дополнительно к этому, лиганд 2 образует водородную связь с остатком Arg212 (Рисунок 50Б).

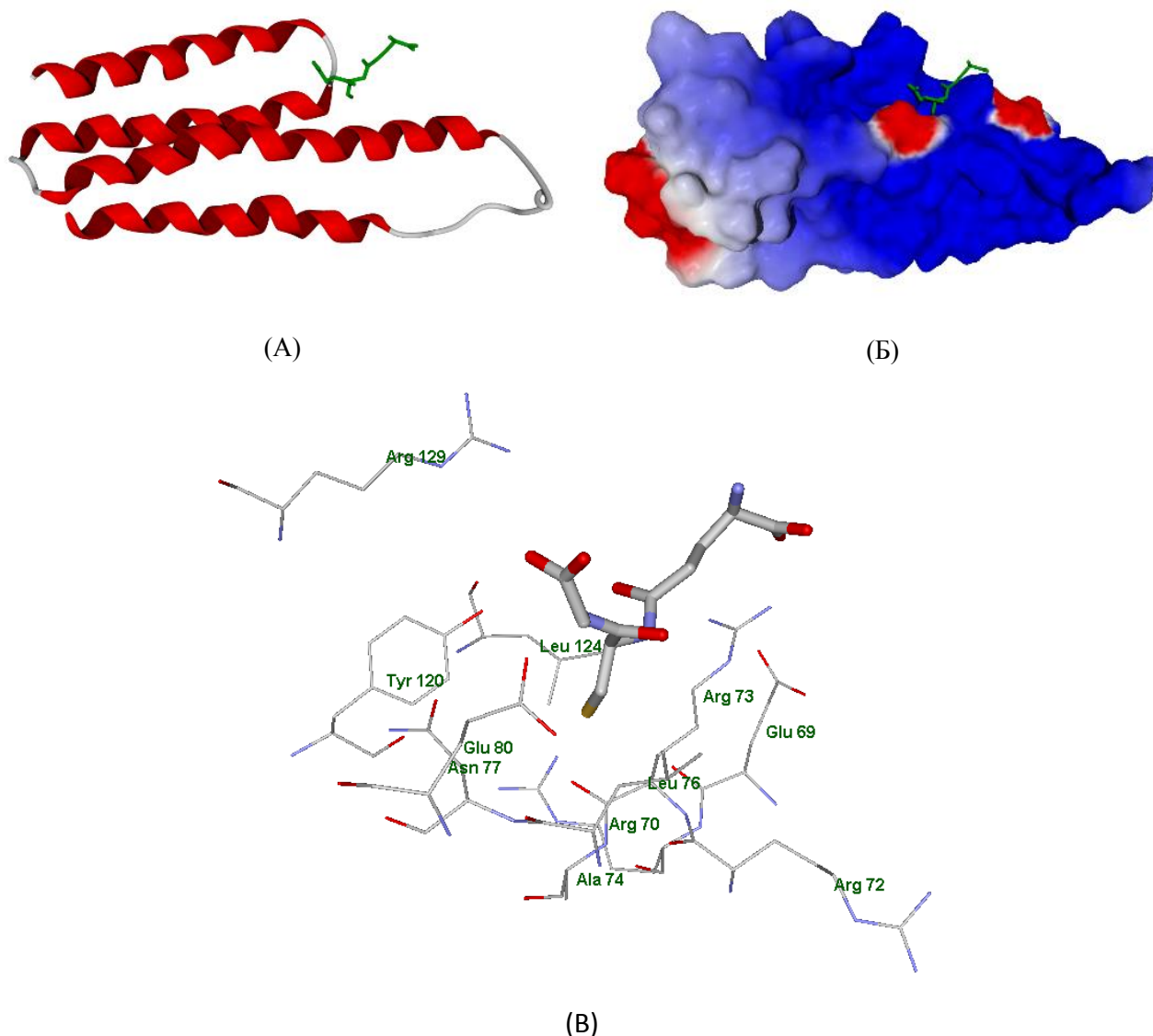


**Рисунок 50** – Конформации соединений 1 (А) и 2 (Б) в сайте связывания цитохрома P<sub>450</sub> (изоформа CYP3A4), полученные в результате докинга с использованием структуры PDB 6UNJ. Атомы водорода скрыты. Показаны гемовая часть фермента (выделена сиреневым) и аминокислотные остатки в пределах 3 Å от лиганда. Водородные связи изображены синими пунктирными линиями

Значения оценочной функции Ds (MolDock Docking Score) [303] заметно отрицательны и составляют -203,2 и -141,9 условных единиц для соединений 1 и 2 соответственно, что дает возможность говорить о хорошем сродстве этих молекул к CYP3A4, изофермент семейства цитохрома P<sub>450</sub> и участвует в метаболизме до 50-60 % всех лекарственных средств [42].

Для докинга исследуемых соединений в сайт связывания глутатионтрансферазы (изоформа MGST1) была выбрана структура 2H8A из Protein Data Bank, содержащая белковую цепь фермента в комплексе с глутатионом (GSH, соединение 4). Общий вид комплекса и аминокислотные остатки вблизи сокристаллизованного лиганда 4 показан на Рисунке 50, А–В.

Докинг цикориевой и хлорогеновой кислот в глутатионтрансферазу MGST1 (в сайт связывания глутатиона) позволил получить для них наилучшие конформации, показанные на Рисунке 51. Согласно этим данным, молекулы оксикоричных кислот имеют широкие возможности для образования водородных связей.

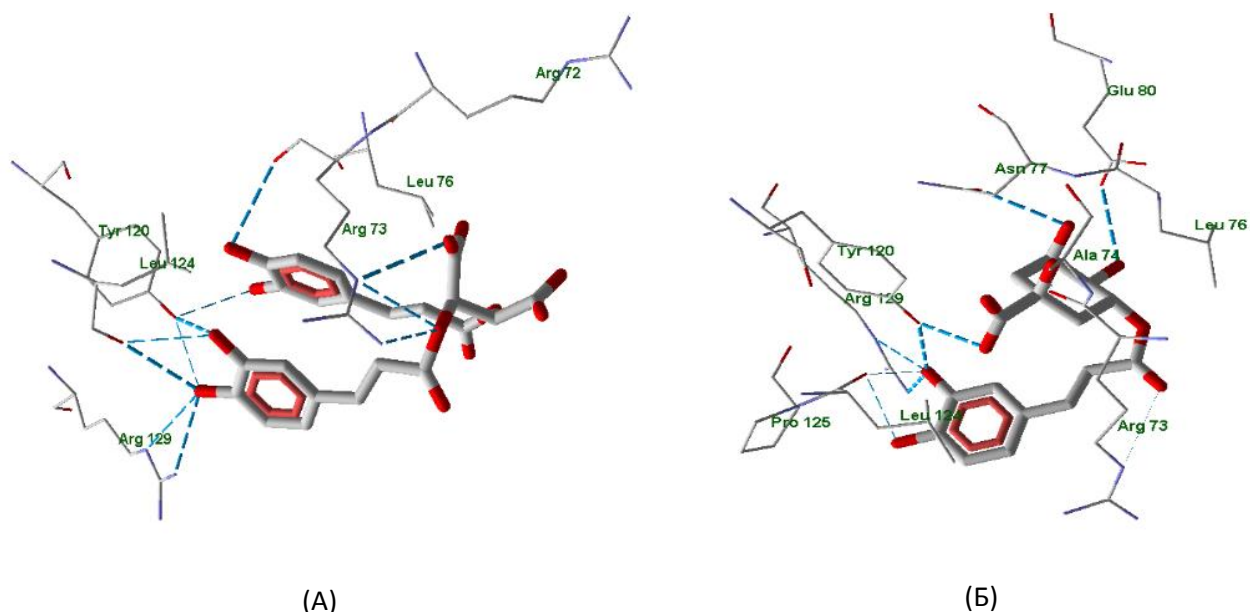


*Примечание* – (A): Общий вид белковой цепи фермента со связанной молекулой глутатиона 4 (выделена зеленым). (B): комплекс MGST1 с соединением 4 (выделено зеленым). Белок показан в виде поверхности, окрашенной в зависимости от электростатического потенциала (синий и красный цвет – соответственно положительно и отрицательно заряженные области). (C): Расположение соединения 4 в сайте связывания. Показаны аминокислотные остатки в пределах 6 Å от молекулы 4

**Рисунок 51** – Строение изоформы MGST1 глутатионтрансферазы с сокристаллизованным лигандом 4 (PDB: 2H8A) [184]

Так, цикориевая кислота зафиксирована внутри активного центра фермента за счет Н-связывания с аминокислотными остатками Arg73, Tyr120, Leu124, Arg129 с участием фенольных гидроксильных групп, а также карбоксильной группы и сложноэфирного атома кислорода лиганда (Рисунок 52А). Аналогично, хлорогеновая кислота образует водородные связи с остатками Arg73, Asn77, Glu80, Tyr120, Leu124, Arg129 с участием гидроксильных групп как в ароматической, так и в углеводной частях лиганда, а также за счет карбоксильной группы (Рисунок 52Б). Следует отметить, что

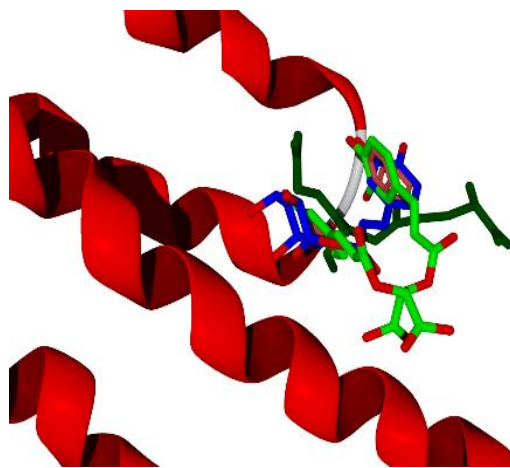
соединения 1 и 2 занимают ту же область пространства внутри сайта связывания, что и молекула глутатиона в структуре 2H8A (Рисунок 53).



**Рисунок 52** – Конформации соединений 1 (А) и 2 (Б) 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

Значения оценочной функции Ds (MolDock Docking Score) [303] для соединений 1 и 2 составляют -121,8 и -102,1 условных единиц соответственно, что позволяет говорить о сродстве этих молекул к глутатионтрансферазе MGST1.

Полученные с помощью молекулярного докинга результаты позволяют предположить механизм антитоксического действия оксикоричных кислот (хлорогеновая и цикориевая) из травы дикорастущего цикория обыкновенного за счет их связывания с ключевыми ферментами системы биотрансформации-детоксикации цитохромом P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазой.



**Рисунок 53** – Совмещение молекулярных структур в сайте связывания глутатионтрансферазы MGST1 (PDB: 2H8A): сокристаллизованная молекула глутатиона (выделена темно-зеленым) и конформации, полученные при докинге соединений 1 (светло-зеленый скелет) и 2 (синий скелет)

Таким образом, исследование БАС надземной части цикория обыкновенного (как дикорастущего, так и культивируемого растения) показало широкие возможности использования специфических ферментных биотест-систем: применяя различные их сочетаниями выбран перспективный экстракт для разработки лекарственного препарата гепатопротективного и иммуномодулирующего действия на его основе; выявлена группа целевых БАС (гидроксикоричные кислоты), которые играют важную роль в гепатопротективном действии субстанции за счет своих антиоксидантных, противовоспалительных свойств; предложен один из возможных механизмов гепатопротективного действия субстанции из дикорастущего сырья, заключающийся в способности гидроксикоричных кислот связываться с активными центрами цитохрома P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазы.

### Выводы к главе 7

1. На примере субстанций из дикорастущего (травы) и культивируемого (листья) цикория обыкновенного продемонстрированы **функциональные возможности СФБТС**:

– с применением первичных и вторичных СФБТС **проведен скрининг биологической активности** двух субстанций и показано, что трава цикория (дикорас-

тущее сырье) является перспективным источником БАС гепатопротективного действия, в то время как листья (культивируемое сырье) – иммуномодулирующего действия;

– используя вторичную СФБТС на основе цит P<sub>450</sub> и ГТФ **выявлены целевые группы БАС**, ответственные за гепатопротективную активность экстракта травы цикория обыкновенного – гидроксикоричные кислоты;

– оценка активности БАС экстракта травы цикория обыкновенного с использованием СФБТС на основе цит P<sub>450</sub> 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, что было проиллюстрировано с помощью молекулярного докинга;

– СФБТС **позволяют оценивать безопасность БАС**, что продемонстрировано в данной главе: в опытах *in vitro* установлено, что внесение гидроксикоричных кислот в инкубационную среду приводит к увеличению скорости ферментативных реакций, катализируемых цитохромом P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазой. В связи с чем при приёме препаратов травы цикория обыкновенного необходимо учитывать данное взаимодействие для предотвращения лекарственного взаимодействия с другими фармакотерапевтическими лекарственными средствами, метаболизирующимися CYP3A4 и GST1 для получения положительных эффектов и избегания нежелательных лекарственных реакций.

2. Таким образом, результаты, полученные с помощью биотест-систем молекулярного и организменного уровней, являются сопоставимыми.

## **Глава 8. ЭКОНОМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ**

Сравнительные расчеты экономической эффективности использования биотест-систем молекулярного (СФБТС) и организменного (лабораторные животные) уровней для оценки БАС проводили на примере:

1) 3 сухих экстрактов травы серпухи венценосной с различным содержанием экидистероида 20-гидроксиэкидизона: 4 %, 7 % и 24 %;

2) 4 сухих экстрактов красных листьев винограда культурного различных сортов для выбора перспективных субстанций для создания на их основе лекарственных препаратов адаптогенного и венотропного действия.

### **8.1 Расчет стоимости исследования адаптогенной активности субстанций из травы серпухи венценосной**

#### **Затраты на материалы и реактивы**

Затраты на материалы и реактивы исследования определяются из количества в натуральном выражении, израсходованного на исследование, цен на лабораторных животных, реактивы, транспортно-заготовительных затрат (принимаемых равными 10 % от стоимости всех материальных затрат). Данные о ценах на реактивы взяты из каталога «Merck KGaA» и за 2021 год (курс евро: 87,76 руб. на 12.03.2022), а также из прайс-листа их официального дилера ООО ТД «ХИММЕД».

Стоимость исследования определяли из расчета использования биотест-систем молекулярного уровня (вторичная СФБТС на основе каталазы и глутатионредуктазы) и организменного уровня (лабораторные животные, с применением трех методик: теста «Вынужденное плавание с грузом» на мышах, оценки влияния на выживаемость мышей в стандартном тесте гипоксической гипоксии с гиперкапнией и «открытое поле норкового типа» на крысах).

Стоимость реактивов, лабораторных животных и расходных материалов для проведения исследований *in vivo* и транспортно-заготовительные затраты (Таблица 38) рассчитывали на 5 недель эксперимента, количество животных в группе составляло 10 шт. (2 недели – содержание лабораторных животных в карантине и 3 недели



– проведение эксперимента: 1 неделя изучение одного экстракта на одной экспериментальной модели) в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований [86].

**Таблица 38** – Стоимость реактивов, материалов и транспортно-заготовительные затраты на 5 недель эксперимента в опытах *in vivo*

| <i>Наименование материальных ресурсов</i>   | <i>Ед. изм.</i> | <i>Кол-во</i> | <i>Цена, руб.</i> | <i>Сумма, руб.</i> |
|---|-----------------|---------------|-------------------|--------------------|
| Крысы нелинейные самцы половозрелые, масса 200–220 г  | шт.             | 120           | 701,00            | 84120,00           |
| Мыши нелинейные самцы половозрелые, масса 18–20 г   | шт.             | 240           | 564,00            | 134360,00          |
| Зонд для внутрижелудочного введения крысам  | шт.             | 2             | 1800,00           | 3600,00            |
| Зонд для внутрижелудочного введения мышам   | шт.             | 2             | 1500,00           | 3000,00            |
| Ванночки для содержания крыс с поилкой и кормушкой  | шт.             | 4             | 7438,00           | 29752,00           |
| Ванночки для содержания мышей с поилкой и кормушкой   | шт.             | 8             | 2124,00           | 16992,00           |
| Опилки  | кг              | 90,6          | 30,00             | 2718,00            |
| Корм  | кг              | 90,6          | 90,00             | 8154,00            |
| Пипетка автоматическая Ассимах 100–1000 мкл   | шт.             | 2             | 8370,00           | 16740,00           |
| Наконечники для пипеток до 1000 мкл   | шт.             | 300           | 990,00            | 330,00             |
| Хлоралгидрат (ВР, Ph. Eur.)   | мг              | 500           | 12000,00          | 12000,00           |
| Фильтровальная бумага   | упк.            | 1             | 1425,00           | 1425,00            |
| Одноразовые резиновые перчатки (Россия)   | упк.            | 1             | 500,00            | 500,00             |
| Емкости с притертыми крышками, 500 мл   | шт.             | 12            | 120,0             | 1440,00            |
| <b>Итого:</b>   |                 |               |                   | 315131,00          |
| Транспортно-заготовительные затраты:  |                 |               |                   | 31513,10*          |
| <b>Всего:</b>   |                 |               |                   | <b>346644,10</b>   |
| <i>Примечание</i> – * – Транспортно-заготовительные расходы принимаются в размере 10 % от стоимости сырья и материалов [79] |                 |               |                   |                    |

Стоимость реактивов, расходных материалов и транспортно-заготовительных затрат при проведении экспериментов с применением вторичной СФБТС (Таблица 39) рассчитывали на 1 неделю эксперимента и 5 повторностей для каждой ферментативной реакции.



**Таблица 39** – Стоимость реактивов, материалов и транспортно-заготовительные затраты на 3 недели эксперимента с использованием СФБТС

| <i>Наименование материальных ресурсов</i>   | <i>Ед. изм.</i> | <i>Кол-во</i> | <i>Цена, руб.</i> | <i>Сумма, руб.</i> |
|---|-----------------|---------------|-------------------|--------------------|
| Перекись водорода   | кг              | 1,1           | 333,30            | 333,30             |
| Аммония молибдат  | кг              | 0,5           | 2420,20           | 1210,1             |
| Трис  | кг              | 0,5           | 1288,00           | 644,0              |
| Кислота соляная   | л               | 1             | 40,80             | 40,8               |
| Каталаза  | уп.             | 1             | 7438,00           | 7438,00            |
| НАДФН   | уп.             | 1             | 2 569,02          | 2 569,02           |
| Калия фосфат 1з   | кг              | 0,1           | 800,40            | 80,04              |
| Калия фосфат 2з   | кг              | 0,2           | 642,40            | 128,48             |
| ЭДТА  | уп.             | 1             | 1260,00           | 1260,00            |
| Глутатионредуктаза, 100 ед  | шт              | 1             | 3067,86           | 3067,86            |
| Глутатион окисленный  | уп.             | 1             | 3260,60           | 3260,60            |
| Пипетка автоматическая Ассимах 100–1000 мкл   | шт.             | 1             | 8370,00           | 8370,00            |
| Пипетка автоматическая Ассимах 5–300 мкл  | шт.             | 1             | 8370,00           | 8370,00            |
| Наконечники для пипеток 100–1000 мкл  | уп.             | 1             | 1 807,61          | 1 807,61           |
| Наконечники для пипеток 5–300 мкл   | уп.             | 1             | 2 017,80          | 2 017,80           |
| Фильтровальная бумага   | упк.            | 1             | 1425,00           | 1425,00            |
| Одноразовые резиновые перчатки (Россия)   | упк.            | 1             | 500,00            | 500,00             |
| Пробирки Эппендорф, 1,5 мл  | уп              | 1             | 261,68            | 261,68             |
| <b>Итого:</b>   |                 |               |                   | 42784,29           |
| Транспортно-заготовительные затраты:  |                 |               |                   | 4278,43            |
| <b>Всего:</b>   |                 |               |                   | <b>47062,72</b>    |
| <i>Примечание</i> – * – Транспортно-заготовительные расходы принимаются в размере 10 % от стоимости сырья и материалов [79] |                 |               |                   |                    |

### Расчет затрат на электроэнергию и воду

Расчет затрат на электроэнергию ведется по формуле (8):

$$E_{\text{э}} = \sum N_i \cdot t_i \cdot \text{Ц} \cdot K_{\text{и}}, \quad (8)$$

где  $N_i$  – мощность электроприбора по паспорту, кВт;

$t_i$  – время работы электроприбора в период выполнения эксперимента, ч;

Ц – цена одного кВт·ч (по данным бухгалтерии ФГБНУ ВИЛАР 5,66 руб.);  
 К<sub>и</sub> – коэффициент мощности электроприборов, равный 0,8.

Результаты расчета приведены в Таблице 40.

Таблица 40 – Расчет затрат на электроэнергию в опытах *in vivo*

| Наименование прибора                                 | Мощность прибора, кВт | Время работы, ч | Сумма, руб.   |
|--|-----------------------|-----------------|---------------|
| Весы аналитические «ER-182 А»                        | 0,01                  | 10,5            | 0,475         |
| Холодильник «LG» (Корея)                             | 0,13                  | 300             | 176,59        |
| Компьютер «Intel Pentium»                            | 0,30                  | 200             | 271,68        |
| Аквадистиллятор электрический Liston A1204, (Россия) | 3,0                   | 6               | 80,64         |
| <b>Всего:</b>  |                       |                 | <b>529,38</b> |

Результаты расчета затрат на электроэнергию при проведении исследований с применением СФБТС приведены в Таблице 41.

Таблица 41 – Расчет затрат на электроэнергию в опытах с использованием СФБТС

| Наименование прибора                                  | Мощность прибора, кВт | Время работы, ч | Сумма, руб.   |
|---|-----------------------|-----------------|---------------|
| Весы аналитические «ER-182 А» (AND, Япония)           | 0,01                  | 3,5             | 0,158         |
| Холодильник «LG» (Корея)                              | 0,13                  | 504             | 296,67        |
| Компьютер "Intel Pentium"                             | 0,30                  | 400             | 543,36        |
| Аквадистиллятор электрический Liston A1204, (Россия)  | 3,0                   | 3               | 40,72         |
| pH-метр F-20-Standart Mettler Toledo                  | 0,01                  | 1               | 0,04          |
| Фотометр биохимический полуавтоматический Clima MC-15 | 0,2                   | 10              | 9,06          |
| <b>Всего:</b>   |                       |                 | <b>890,01</b> |

Затраты на воду для технологических нужд определяются исходя из количества израсходованной воды в м<sup>3</sup> и тарифа на воду:

$$E_{\text{э}} = \sum P_{\text{в}} \cdot t_{\text{в}} \cdot \text{Ц}, \quad (9)$$

где P<sub>в</sub> – часовой расход воды, м<sup>3</sup>/ч;

t<sub>в</sub> – время работы, ч;

Ц – тариф на чистую воду со стоками (цена 1 м<sup>3</sup> воды с учетом слива в канализацию), (75,59 руб./м<sup>3</sup> по данным бухгалтерии ВИЛАР).

Результаты расчета для исследований в условиях опытов *in vivo* приведены в Таблице 42.

Таблица 42 – Расчет затрат на воду при проведении исследований *in vivo*

| Наименование работ | Расход воды, м <sup>3</sup> /ч | Время работы, ч | Сумма, руб. |
|--------------------|--------------------------------|-----------------|-------------|
| Мытье посуды       | 0,3                            | 80              | 1814,16     |
| Питье животных     | 0,5                            | 35              | 1322,83     |
| Мытье клеток       | 3,0                            | 35              | 7936,95     |
| Дистилляция воды   | 0,65                           | 6               | 294,80      |
| <b>Всего:</b>      |                                |                 | 11368,74    |

Результаты расчета для исследований с использованием СФБТС приведены в Таблице 43.

Таблица 43 – Расчет затрат на воду в опытах с использованием СФБТС

| Наименование     | Расход воды, м <sup>3</sup> /ч | Время работы, ч | Сумма, руб. |
|------------------|--------------------------------|-----------------|-------------|
| Мытье посуды     | 0,3                            | 10              | 226,77      |
| Дистилляция воды | 0,65                           | 3               | 147,40      |
| <b>Всего:</b>    |                                |                 | 374,17 руб. |

Следовательно, затраты на электричество и воду составляют:

– при проведении исследований *in vivo*:  $529,38 + 11368,74 = 13544,37$  руб.;

– с применением СФБТС:  $890,01 + 374,17 = 1264,18$  руб.

#### **Затраты на заработную плату**

Основная заработная плата исполнителя работы рассчитывается, исходя из минимальной заработной платы научного сотрудника без степени, равной 26400 руб. и лаборанта вивария – 15800 руб. (только в экспериментах *in vivo*). Время проведения работы по исследованию *in vivo* – 5 недель, с использованием СФБТС *in vitro* – 3 недели.

Тогда, заработная плата исполнителей при проведении исследований *in vivo* составляет:

1) научный сотрудник:  $26400 \times 0,75 = 19800,00$  руб.;

2) лаборант:  $15800 \times 1,25 = 19750,00$  руб.

Итого: 31650,00 руб.

Заработная плата исполнителя при исследованиях с применением СФБТС:

– научный сотрудник:  $26400 \times 0,25 = 6600$  руб.

Итого: 6600,00 руб.

Начисления в Фонд оплаты труда в социальные фонды считаются для работников высшей школы и научных учреждений в размере 26 % от суммы основной и дополнительной заработной плат и составляют:

1. Исследования *in vivo*:

– научный сотрудник:  $33000,00 \times 0,26 = 8580,00$  руб.;

– лаборант:  $19750,00 \times 0,26 = 5135,00$  руб.

Итого: 13715,00 руб.

2. С применением СФБТС:

– научный сотрудник:  $6600 \times 0,26 = 1716$  руб.

Итого: 1716,00 руб.

Затраты на заработную плату с начислениями в социальные фонды составляют:

1) исследования *in vivo*:  $52750,00 + 13715,00 = 66465,00$  руб.;

2) с применением СФБТС:  $6600,00 + 1716,00 = 8316,00$  руб.

### **Расчет накладных расходов**

Накладные расходы принимаются в размере 200 % от суммы основной и дополнительной заработной платы без начислений в социальные фонды:

– исследования *in vivo*:  $66465,00 \times 2 = 132930,00$  руб.;

– с применением СФБТС:  $8316,00 \times 2 = 16\,632,00$  руб.

### **Суммарные затраты на выполнение работ**

Результаты расчета суммарных затрат при проведении исследований *in vivo* и с применением СФБТС представлены в Таблице 44.

**Таблица 44** – Смета затрат 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) |
|---------------------------------|---------------------------------------|---|----------------------------|--------------------------------|
| Сырье и материалы               | 346644,10                             | 63,4                                      | 47062,72                   | 64,6                           |
| Энергозатраты                   | 529,38                                | 0,1                                       | 890,01                     | 1,2                            |
| Заработная плата с начислениями | 66465,00                              | 12,2                                      | 8316,00                    | 11,4                           |
| Накладные расходы               | 132930,00                             | 24,3                                      | 16632,00                   | 22,8                           |
| <b>Всего:</b>                   | 546 568,48                            | 100                                       | 72 900,73                  | 100                            |

Таким образом, результаты проведенных экономических расчетов показали целесообразность использования СФБТС при оценке биологически активных соединений на примере трех серпухи венценосной травы экстрактов сухих с различным содержанием фитостероидов, так как это позволяет сократить затраты: временные в 3 раза, финансовые в 4,4 раза, количества лабораторных животных в 3 раза.

## **8.2 Расчет стоимости исследования венотропной активности субстанций из красных листьев винограда культурного**

Стоимость исследования определяли из расчета использования вторичной СФБТС на основе каталазы, глутатионтредуктазы и пируваткиназы в сравнении с исследованиями на организменном уровне с применением 7 экспериментальных моделей: 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.

Стоимость реактивов, лабораторных животных и расходных материалов для проведения исследований *in vivo* и транспортно-заготовительные затраты (Таблица 45) рассчитывали на 6 недель, количество животных в группе составляло 10 шт. (2 недели – содержание лабораторных животных в карантине и 4 недели – проведение

эксперимента: 1 неделя изучение одного экстракта в двух дозах) в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований [85].

Таблица 45 – Стоимость реактивов, материалов и транспортно-заготовительные затраты на эксперименты при проведении исследований *in vivo*

| Наименование материальных ресурсов  | Ед. изм. | Кол-во | Цена, руб. | Сумма, руб.         |
|---|----------|--------|------------|---------------------|
| Крысы нелинейные самцы половозрелые, масса 200-220 г  | шт.      | 240    | 701,00     | 168240,00           |
| Мыши нелинейные самцы половозрелые, масса 18-20 г   | шт.      | 640    | 564,00     | 360960,00           |
| Кролики-самцы породы «Советская шиншилла» массой 3,0 – 3,5 кг   | шт.      | 60     | 3520       | 211200,00           |
| Зонд для внутрижелудочного введения крысам  | шт.      | 2      | 1800,00    | 3600,00             |
| Зонд для внутрижелудочного введения мышам   | шт.      | 2      | 1500,00    | 3000,00             |
| Ванночки для содержания крыс с поилкой и кормушкой  | шт.      | 6      | 7438,00    | 44628,00            |
| Ванночки для содержания мышей с поилкой и кормушкой   | шт.      | 16     | 2124,00    | 33984,00            |
| Клетки для содержания кроликов  | шт.      | 60     | 15900      | 954000,00           |
| Опилки  | кг       | 416,6  | 30,00      | 12498,00            |
| Корм (крысы/мыши)   | кг       | 416,6  | 90,00      | 37497,60            |
| Корм (кролики)  | кг       | 72     | 66,00      | 4752,00             |
| Натрий цитрат 2-водный  | г        | 500    | 1260,00    | 1260,00             |
| Аденозин-5-дифосфат монокалийевая соль дигидрат   | мг       | 100    | 470,00     | 470,00              |
| Формальдегид 37 %   | мл       | 1000   | 5000,00    | 5000,0              |
| Трипановый синий  | г        | 100    | 1764,00    | 7056,00             |
| мета-Ксилол   | мл       | 250    | 5752,00    | 5752,00             |
| Уксусная кислота (ледяная) 100 % чда фарм.  | мл       | 400    | 1280,00    | 5120,00             |
| Пипетка автоматическая Accutax 100-1000 мкл   | шт.      | 2      | 8370,00    | 16740,00            |
| Наконечники для пипеток до 1000 мкл   | шт.      | 300    | 990,00     | 330,00              |
| Фильтровальная бумага   | упк.     | 1      | 1425,00    | 1425,00             |
| Одноразовые резиновые перчатки (Россия)   | упк.     | 2      | 500,00     | 1000,00             |
| Емкости с притертыми крышками, 500 мл   | шт.      | 12     | 120,0      | 1440,00             |
| <b>Итого:</b>   |          |        |            | 1 879 952,60        |
| Транспортно-заготовительные затраты:  |          |        |            | 187 995,26*         |
| <b>Всего:</b>   |          |        |            | <b>2 067 947,86</b> |
| <i>Примечание</i> – * – Транспортно-заготовительные расходы принимаются в размере 10 % от стоимости сырья и материалов [79] |          |        |            |                     |

Стоимость реактивов, расходных материалов и транспортно-заготовительных затрат при проведении экспериментов с применением СФБТС (Таблица 46) рассчитывали на 1 неделю эксперимента и 5 повторностей для каждой ферментативной реакции.

Таблица 46 – Стоимость реактивов, материалов и транспортно-заготовительные затраты эксперименты с применением СФБТС

| <i>Наименование материальных ресурсов</i>       | <i>Ед. изм.</i> | <i>Кол-во</i> | <i>Цена, руб.</i> | <i>Сумма, руб.</i> |
|---|-----------------|---------------|-------------------|--------------------|
| Натрий цитрат 2-водный                          | г               | 500           | 1260,00           | 1260,00            |
| Хлорид магния                                   | г               | 500           | 389,00            | 194,50             |
| Хлорид калия                                    | г               | 500           | 300,00            | 150,00             |
| Аденозин-5-дифосфат монокалийевая соль дигидрат | мг              | 100           | 470,00            | 470,00             |
| Трипановый синий                                | г               | 25            | 1764,00           | 1764,00            |
| Пипетка автоматическая Асситах 100 -1000 мкл    | шт.             | 2             | 8370,00           | 16740,00           |
| Наконечники для пипеток до 1000 мкл             | шт.             | 300           | 990,00            | 330,00             |
| Фильтровальная бумага                           | упк.            | 1             | 1425,00           | 1425,00            |
| Одноразовые резиновые перчатки (Россия)         | упк.            | 2             | 500,00            | 1000,00            |
| Емкости с притертыми крышками, 500 мл           | шт.             | 12            | 120,0             | 1440,00            |
| Трис  | кг              | 0,5           | 1288,00           | 644,00             |
| Кислота соляная                                 | л               | 1             | 40,80             | 40,80              |
| Каталаза  | упк.            | 1             | 7438,00           | 7438,00            |
| НАДФН   | упк.            | 1             | 2 569,02          | 2569,02            |
| Калия фосфат 1з                                 | кг              | 0,1           | 800,40            | 800,40             |
| Калия фосфат 2з                                 | кг              | 0,2           | 642,40            | 128,48             |
| ЭДТА  | упк.            | 1             | 1260,00           | 1260,00            |
| Глутатионредуктаза, 100 ед                      | шт              | 1             | 3067,86           | 3067,86            |
| Глутатион окисленный                            | упк.            | 1             | 3260,60           | 3260,60            |
| НАДН  | г               | 1             | 2540,00           | 1270,00            |
| Лактатдегидрогеназа                             | ед.             | 100000        | 16 555,00         | 16555,00           |
| Пируваткиназа                                   | ед.             | 1000          | 4082,00           | 4082,00            |
| Фосфоенолпируват                                | мг              | 250           | 6037,50           | 6037,50            |

## Продолжение таблицы 46

| <i>Наименование материальных ресурсов</i>   | <i>Ед. изм.</i> | <i>Кол-во</i> | <i>Цена, руб.</i> | <i>Сумма, руб.</i> |
|---|-----------------|---------------|-------------------|--------------------|
| <b>Итого:</b>   |                 |               |                   | 48614,58           |
| Транспортно-заготовительные затраты:  |                 |               |                   | 4861,46*           |
| <b>Всего:</b>   |                 |               |                   | <b>53 476,04</b>   |
| <i>Примечание – * – Транспортно-заготовительные расходы принимаются в размере 10 % от стоимости сырья и материалов [79]</i> |                 |               |                   |                    |

**Расчет затрат на электроэнергию и воду**

Расчет затрат на электроэнергию ведется по формуле:

$$E_{\text{э}} = \sum N_i \cdot t_i \cdot \text{Ц} \cdot K_{\text{и}}, \quad (10)$$

где  $N_i$  – мощность электроприбора по паспорту, кВт;

$t_i$  – время работы электроприбора в период выполнения эксперимента, ч;

Ц – цена одного кВт·ч (по данным бухгалтерии ФГБНУ ВИЛАР 5,66 руб.);

$K_{\text{и}}$  – коэффициент мощности электроприборов, равный 0,8.

Результаты расчета приведены в Таблице 47.

**Таблица 47** – Расчет затрат на электроэнергию при использовании тест-систем организменного уровня

| <i>Наименование прибора</i>                             | <i>Мощность прибора, кВт</i> | <i>Время работы, ч</i> | <i>Сумма, руб.</i> |
|---|------------------------------|------------------------|--------------------|
| Весы аналитические «ER-182 А»                           | 0,01                         | 30                     | 0,27               |
| Холодильник «LG»  | 0,25                         | 1008                   | 1598,4             |
| Компьютер "Intel Pentium"                               | 0,53                         | 160                    | 112,95             |
| Аквадистиллятор электрический                           | 3,0                          | 6                      | 799,20             |
| Двухканальный лазерный анализатор агрегации тромбоцитов | 0,25                         | 8                      | 133,20             |
| Центрифуга лабораторная ЦЛМН                            | 1,80                         | 6                      | 532,80             |
| <b>Всего:</b>   |                              |                        | <b>3176,82</b>     |

Результаты расчета затрат на электроэнергию при проведении исследований с применением СФБТС приведены в Таблице 48.



Таблица 48 – Расчет затрат на электроэнергию в опытах с применением СФБТС

| Наименование прибора                                  | Мощность прибора, кВт | Время работы, ч | Сумма, руб.   |
|---|-----------------------|-----------------|---------------|
| Весы аналитические «ER-182 А»                         | 0,01                  | 20              | 0,18          |
| Холодильник «LG» (Корея)                              | 0,25                  | 180             | 1065,60       |
| Компьютер "Intel Pentium"                             | 0,53                  | 80              | 37,65         |
| Аквадистилятор электрический                          | 3,0                   | 3               | 40,72         |
| pH-метр F-20-Standart                                 | 0,01                  | 1               | 0,09          |
| Фотометр биохимический полуавтоматический Clima MC-15 | 0,2                   | 10              | 0,36          |
| <b>Всего:</b>   |                       |                 | <b>1144,6</b> |

Затраты на воду для технологических нужд определяются исходя из количества израсходованной воды в м<sup>3</sup> и тарифа на воду:

$$E_{\text{э}} = \sum P_{\text{в}} \cdot t_{\text{в}} \cdot \text{Ц}, \quad (11)$$

где  $P_{\text{в}}$  – часовой расход воды, м<sup>3</sup>/ч;

$t_{\text{в}}$  – время работы, ч;

Ц – тариф на чистую воду со стоками (цена 1 м<sup>3</sup> воды с учетом слива в канализацию), (75,59 руб./м<sup>3</sup> по данным бухгалтерии ВИЛАР).

Таблица 49 – Расчет затрат на воду при проведении исследований *in vivo*

| Наименование работ | Расход воды, м <sup>3</sup> /ч | Время работы, ч | Сумма, руб.      |
|--------------------|--------------------------------|-----------------|------------------|
| Мытье посуды       | 0,3                            | 100             | 2267,7           |
| Питье животных     | 0,5                            | 58              | 2192,11          |
| Мытье клеток       | 3,0                            | 60              | 13606,20         |
| Дистилляция воды   | 0,65                           | 8               | 393,07           |
| <b>Всего:</b>      |                                |                 | <b>18 459,08</b> |

Результаты расчета для исследований с использованием СФБТС приведены в Таблице 50.

Таблица 50 – Расчет затрат на воду в опытах с применением СФБТС

| Наименование работ | Расход воды, м <sup>3</sup> /ч | Время работы, ч | Сумма, руб.     |
|--------------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|
| Мытье посуды       | 0,3                            | 48              | 1088,50         |
| Дистилляция воды   | 0,65                           | 5               | 245,67          |
| <b>Всего:</b>      |                                |                 | <b>1 334,17</b> |

Следовательно, затраты на электричество и воду составляют:

– фармакологические методы *in vivo*:  $3176,82 + 18459,08 = 21635,90$  руб.;

– с использованием СФБТС:  $1144,60 + 1334,17 = 2\,478,77$  руб.

### **Затраты на заработную плату**

Основная заработная плата исполнителя работы рассчитывается, исходя из минимальной заработной платы научного сотрудника без степени, равной 26400 руб. и лаборанта вивария – 15800 руб. (только в экспериментах *in vivo*). Время проведения работы по исследованию *in vivo* – 6 недель, с использованием СФБТС – 1 неделя.

Тогда, заработная плата исполнителей при проведении опытов *in vivo* составляет:

1) научный сотрудник:  $26400 \times 1,25 = 39600,00$  руб.;

2) лаборант:  $15800 \times 1,25 = 23700,00$  руб.

Итого: 63300,00 руб.

Заработная плата исполнителя при исследованиях с применением СФБТС:

– научный сотрудник:  $26400 \times 0,25 = 6600,00$  руб.

Итого: 6600,00 руб.

Начисления в Фонд оплаты труда в социальные фонды считаются для работников высшей школы и научных учреждений в размере 26 % от суммы основной и дополнительной заработной плат и составляют:

1. Исследования *in vivo*:

– научный сотрудник:  $39600,00 \times 0,26 = 10296,00$  руб.;

– лаборант:  $23700,00 \times 0,26 = 6162,00$  руб.

Итого: 16458,00 руб.

2. С применением СФБТС: научный сотрудник:  $6600,00 \times 0,26 = 1716,00$  руб.

Итого: 1716,00 руб.

Затраты на заработную плату с начислениями в социальные фонды составляют:

1) исследования *in vivo*:  $63300,00 + 16458,00 = 79758,00$  руб.;

2) с применением СФБТС:  $6600,00 + 1716,00 = 8316,00$  руб.

### Расчет накладных расходов

Накладные расходы принимаются в размере 200 % от суммы основной и дополнительной заработной платы без начислений в социальные фонды:

– исследования *in vivo*:  $79758,00 \times 2 = 159516,00$  руб.;

– с применением СФБТС:  $8316,00 \times 2 = 16632,00$  руб.

### Суммарные затраты на выполнение работы

Расчет суммарных затрат на выполнение исследований в условиях опытов *in vivo* и с использованием СФБТС *in vitro* представлен в Таблице 51:

**Таблица 51** – Смета затрат 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) |
|---------------------------------|---------------------------------------|---|----------------------------|--------------------------------|
| Сырье и материалы               | 2067947,86                            | 88,80                                     | 53476,04                   | 66,10                          |
| Энергозатраты                   | 21635,90                              | 0,93                                      | 2 478,77                   | 3,06                           |
| Заработная плата с начислениями | 79758,00                              | 3,42                                      | 8316,00                    | 10,28                          |
| Накладные расходы               | 159516,00                             | 6,85                                      | 16632,00                   | 20,56                          |
| <b>Всего:</b>                   | <b>2 328 857,76</b>                   | <b>100</b>                                | <b>80 902,81</b>           | <b>100</b>                     |

Таким образом, результаты проведенных экономических расчетов (Таблица 51) показали целесообразность использования СФБТС при оценке БАС на примере сухих экстрактов красных листьев винограда культурного, так как сокращаются затраты: временные в 6 раз, финансовые в 27 раз, количество лабораторных животных в 7 раз.

### Выводы по главе 8

Проведены сравнительные исследования с использованием молекулярных ферментных биотест-систем и биотест-систем организменного уровня (лабораторные животные), показана достоверность полученных результатов в опытах *in vitro* и сокращение затрат при испытаниях на примере:

– трёх субстанций из травы серпухи венценосной: временных – в 3 раза; финансовых – в 4,4 раза; количества лабораторных животных – в 3 раза;

– четырёх субстанций из красных листьев винограда культурного: временных  
– в 6 раз, финансовых – в 27 раз, количества лабораторных животных – в 7 раз.

## 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 54) 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 54** – 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.

## 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.

### **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.



**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

- АДФ – адендифосфат  
АЛТ – аланинаминотрансфераза  
АСТ – аспартатаминотрансфераза  
АТФ – аденозинтрифосфат  
БАС – биологически активные соединения  
БУ – бутанольная фракция  
ВО – водная фракция  
ГЛС - готовое лекарственное средство  
ГР – глутатионтредуктаза  
ГТФ – глутатионтрансфераза  
ДНХБ – динитрохлорбензол  
ЖЛФ – жидкая лекарственная форма  
ЖСС – жидкая среда Сабуро  
КАТ – каталаза  
ЛРС – лекарственное растительное сырьё  
ЛП – лекарственный препарат  
МПБ – мясо-пептонный бульон  
НАДН – никотинамидадениндинуклеотида  
НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма)  
НД – нормативная документация  
ПК – пируваткиназа  
СП – спиртовая фракция  
СФБТС – специфические ферментные биотест-системы  
СЭВЗ – володушки золотистой травы экстракта сухого  
СЭТС –серпухи венценосной травы экстракт сухой  
ТГ – тирозингидроксилаза  
ТЛФ – твердая лекарственная форма

Цит P<sub>450</sub> – цитохром P<sub>450</sub>

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЭА – этилацетатная фракция

ADME/T – всасывание, распределение, метаболизм и выведение

*C. elegans* – нематоды вида *Caenorhabditis elegans*

*C. Intybus* – *Cichorium intybus* L.

GSSG – окисленный глутатиона дисульфида

GSH – восстановленная форма, глутатион-тиол

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота, цвиттер-ионный органический буферный агент

IAP – значения точности прогноза (PASS)

*in silico* – компьютерное моделирование (симуляция) эксперимента

*in vitro* – технология выполнения экспериментов «в пробирке», вне живого организма

*in vivo* – проведение экспериментов «внутри живого организма»

iNOs – индуцибельная NO-синтаза

P<sub>a</sub> – вероятность принадлежности соединения к классу «активные»

P<sub>i</sub> – вероятность принадлежности соединения к классу «неактивные»

QSAR – модели количественного соотношения структуры и активности

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамов, Г. В. Прогнозирования механизмов фармакологического действия многокомпонентного растительного экстракта с помощью веб-ресурса PASS Online на примере травы цикория обыкновенного / Г. В. Адамов, О. Л. Сайбель, П. Г. Мизина. – DOI 10.29296/25877313-2021-12-05 // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 12, № 24. – С. 36–39.
2. Адамов, Г. В. Разработка технологии получения сухого экстракта плодов витекса священного (*Vitex Agnus-castus* L.) / Г. В. Адамов, О. Л. Сайбель // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения : сборник научных трудов Международной научной конференции. – М., 2020. – С. 303–308.
3. Атлас лекарственных растений России / под общей редакцией Н. А. Сидельникова. – Изд. 2-е, перераб. и доп. – М. : Наука, 2021. – 646 с.
4. Афоничева, П. К. «Орган-на-чипе» – материалы и методы изготовления (обзор) / П. К. Афоничева, А. Л. Буляница, А. А. Евстапов // Научное приборостроение. – 2019. – Т. 29, № 4. – С. 3–18.
5. Балеев, Д. Н. Сравнительный анализ состава и содержания гинзенозидов в каллусной культуре клеток и корне женьшеня обыкновенного, *Panax Ginseng* / Д. Н. Балеев, В. И. Осипов, П. С. Савин [и др.]. – DOI 10.56304/S0234275822020028 // Биотехнология. – 2022. – Т. 38, № 2. – С. 57–69.
6. Боровиков, В. П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA / В. П. Боровиков. – М. : Горячая линия. Телеком, 2014. – 288 с.
7. Бортникова, В. В. Доклиническое изучение эвкалимина – лекарственного средства антимикробного действия / В. В. Бортникова, Л. В. Крепкова, Н. М. Крутикова [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. – Т. 21, № 4. – С. 35–45.
8. Бортникова, В. В. Изучение иммунотоксических свойств препаратов из травы Эхинацеи Пурпурной / В. В. Бортникова, Л. В. Крепкова, А. А. Шкаренков [и др.] // Материалы VIII международного съезда Фитофарм 2004 «Актуальные

проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения» (21–23 июня 2004 г.). – С. 61–65.

9. Бродова, М. С. Исследование фитопрепаратов и оценка их качества с использованием специфических ферментных биотест-систем *in vitro* : автореф. дис. ... канд. фарм. наук : 15.00.02 / Бродова Мария Сергеевна. – М., 2003. – 24 с.

10. Бушуева, Г. Р. Изучение воздействия глубинных условий культивирования на физиологические и биохимические характеристики полученной новой линии клеточного штамма женьшеня (*Panax ginseng* С.А.Меу.) / Г. Р. Бушуева, Т. А. Савина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2015. – № 10. – С. 3–6.

11. Быков, В. А. Использование биотест-систем в обеспечении биобезопасности / В. А. Быков, Ю. И. Денисов-Никольский, Л. Б. Ребров // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2002. – № 10. – С. 42–45.

12. Васильев, А. Н. Требования к безопасности и эффективности растительных лекарственных препаратов: сравнение отечественного и европейского подходов / А. Н. Васильев, Р. Д. Сюбаев, Е. В. Гавришина [и др.] // Ремедиум. – 2014. – № 6. – С. 6–15.

13. Венгеровский, А. И. Методические рекомендации по изучению гепатопротективной активности лекарственных средств / А. И. Венгеровский, В. В. Удут, Д. В. Рейхарт // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. – М. : Гриф и К., 2012. – Часть первая. – 832 с.

14. Венгеровский, А. И. Механизмы действия гепатопротекторов при токсических поражениях печени / А. И. Венгеровский, А. С. Саратиков // Фармакология и токсикология. – 1988. – № 1. – С. 89–93.

15. Вичканова, С. А. Лекарственные средства из растений / С. А. Вичканова, В. К. Колхир, Т. А. Сокольская, И. В. Воскобойникова, В. А. Быков. – М. : АДРИС, 2009. – 432 с.

16. Вишневецкий, В. Ю. Принципы построения биотестовой системы / В. Ю. Вишневецкий, Н. Г. Булавкова, В. С. Ледяева // Известия Южного федерального университета. Технические науки. – 2011. – № 9 (122). – С. 12–17.

17. Габдулхакова, А. Г. Влияние рекомбинантного протимозина  $\alpha$  на активность НАДФН-оксидазы нейтрофилов человека / А. Г. Габдулхакова, Н. Б. Попова, А. В. Ходякова // *International journal of immunorehabilitation*. – 1999. – Т. 12. – С. 15.
18. Гайдай, Е. А. *Caenorhabditis elegans* как модельный объект для биомедицинских исследований / Е. А. Гайдай, А. А. Матичин, Д. С. Гайдай, М. Н. Макарова. – DOI 10.29296/2618723X-2018-04-02 // *Лабораторные животные для научных исследований*. – 2018. – Т. 4. – С. 15–25.
19. Дубинская, В. А. Ферментные тест-системы *in vitro* для первичного скрининга биологически активных веществ / В. А. Дубинская, Т. В. Володина // *Качество и жизнь*. – 2016. – № 1. – С. 67–69.
20. Дул, В. Н. Изучение состава фенольных веществ красных листьев винограда культурного (*Vitis vinifera* L.) методом ВЭЖХ / В. Н. Дул, Т. Д. Даргаева, Я. Ф. Копытько, Т. А. Сокольская // *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств*. – 2014. – № 3. – С. 33–36.
21. Есауленко, Е. Е. Метаболические эффекты льняного масла у крыс с интоксикацией тетрахлорметаном / Е. Е. Есауленко // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 1. – С. 59–63.
22. Жуков, А. А. Стехиометрия реакций микросомального окисления. Распределение редокс-эквивалентов между монооксигеназными и оксидазными реакциями, катализируемыми цитохромом P 450 / А. А. Жуков, А. И. Арчаков // *Биохимия*. – 1985. – № 12 (50). – С. 1939–1952.
23. Зайцева, М. А. Основные подходы к обеспечению качества биологических тест-систем в исследованиях GLP-статуса / М. А. Зайцева, Е. Г. Потапенко, Т. В. Кашина, А. Б. Верведа. – DOI 10.29296/2618723X-2020-02-03 // *Лабораторные животные для научных исследований*. – 2020. – № 2. – С. 29–35.
24. Захарянц, А. А. Доклиническая оценка биотрансформации новых антигипоксических соединений в системе *in vitro* с имитацией микроциркуляции : дис. ... канд. хим. наук : 03.01.06 / Захарянц Арпеник Акоповна. – М., 2016.

25. Иванов, А. С. Биоинформатика: путь от генома к лекарству *in silico* / А. С. Иванов, В. В. Поройков, А. И. Арчаков // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2003. – № 4 (30). – С. 19–23.
26. Ивашкин, В. Т. Лекарственные поражения печени (клинические рекомендации для врачей) / В. Т. Ивашкин, А. Ю. Барановский, К. Л. Райхельсон [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2019. – № 1 (29). – С. 85–115.
27. Ионов, Н. С. Возможности оценок *in silico* для разработки фармкомпозиции фитолатаптоген, цитотоксичной для клеток рака мочевого пузыря / Н. С. Ионов, М. А. Барышникова, Е. В. Бочаров [и др.] // Биомедицинская химия. – 2021. – № 3 (67). – С. 278–288.
28. Канаева, И. П. Исследование микросом клеток печени мыши методами протеомного анализа / И. П. Канаева, Н. А. Петушкова, П. Г. Лохов, В. Г. Згода // Биомедицинская химия. – 2004. – № 4 (50). – С. 367–375.
29. Канунникова, Ю. С. Разработка параметров экстрагирования суммы биологически активных веществ травы володушки золотистой (*Herba Vupleuri aurei*) / Ю. С. Канунникова, М. А. Джавахян // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 5. – С. 35.
30. Канунникова, Ю. С. Актуальность и перспективы разработки активных субстанций на основе травы володушки золотистой (*Herba Vupleuri aurei*) / Ю. С. Канунникова, М. А. Джавахян // «Здравоохранение: образование, наука, инновации» : материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 70-летию Рязанского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова / под редакцией Р. Е. Калинина. – 2013. – С. 170–172.
31. Карузина, И. И. Выделение и свойства цитохрома P450 из микросом печени кроликов / И. И. Карузина, Г. И. Бачманова, Д.Э. Менгазетдинов [и др.] // Биохимия. – 1979. – Т. 6. – С. 1049–1057.

32. Качанов, Д. А. *Danio rerio* (Zebrafish) как универсальный модельный объект в доклинических исследованиях / Д. А. Качанов, Н. М. Лакеенков, К. Е. Левкин [и др.] // *Forcipe*. – 2018. – Т. 1, № 1. – С. 49–54.
33. Кашникова, Т. В. Оценка активности транспортных наносистем, включающих биофлавоноиды, с помощью микросомальной биотест-системы / Т. В. Кашникова, Е. А. Друзь, Н. Б. Фельдман [и др.] // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2009. – № 3. – С. 22–27.
34. Китаева, К. В. Современные методы доклинического скрининга противоопухолевых препаратов с применением тест-систем на основе культур клеток / К. В. Китаева, А. А. Ризванов, В. В. Соловьева. – DOI 10.26907/2542-064X.2021.2.155-176 // *Ученые записки Казанского университета. Серия естественные науки*. – 2021. – Т. 163, № 2. – Р. 155–176.
35. Ковальчук, Л. В. Введение в биохимию оксида азота. Роль оксида азота в регуляции основных систем организма / Л. В. Ковальчук, З. Ф. Хараева // *Иммунология*. – 2003. – № 3. – С. 186–188.
36. Кокарева, Е. С. Анализ влияния субстанций различной природы на селективную активацию  $Ca^{2+}$ -зависимой NO-синтазы (обзор) / Е. С. Кокарева, В. В. Морозов, Я. М. Станишевский, М. А. Журавлева [и др.] // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2018. – № 4 (25). – С. 23–28.
37. Колхир, В. К. Разработка гастро- и гепатопротекторных средств на основе лекарственного растительного сырья. Опыт ВИЛАР / В. К. Колхир, А. И. Багинская, Т. А. Сокольская [и др.] // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2013. – № 11. – С. 41–49.
38. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – СПб. : СпецЛит, 2010. – 95 с.
39. Коробейникова, Е. П. Лабораторные животные – биомодели и тест-системы в фундаментальных и доклинических экспериментах в соответствии со стандартами надлежащей лабораторной практики (НЛП/GLP) / Е. П. Коробейникова, Е. Ф. Комарова // *Журнал фундаментальной медицины и биологии*. – 2016. – № 1. – С. 30–36.

40. Королюк, М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, М. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
41. Крылова, С. Г. Влияние экстракта корня цикория на морфофункциональное состояние печени у крыс с токсическим гепатитом / С. Г. Крылова, Л. А. Ефимова, З. К. Вымятина, Е. П. Зуева. – DOI 10.30906/0869-2092-2006-69-6-34-36 // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – № 6 (69). – С. 34–36.
42. Кукес, В. Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты / В. Г. Кукес. – М. : Реафарм, 2004. – С. 113–120.
43. Куприянов, В. В. Стационарная кинетика пируваткиназы / В. В. Куприянов, Э. К. Сеннет, И. В. Емелин // Биохимия. – 1979. – Т. 1 (44). – С. 104–115.
44. Куркин, В. А. Исследование номенклатуры адаптогенных лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке российской федерации / В. А. Куркин, И. К. Петрухина, А. С. Акушская // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 4 (8). – С. 898–902.
45. Куркин, В. А. Фенилпропаноиды как важнейшая группа биологически активных соединений лекарственных растений / В. А. Куркин // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 7 (12). – С. 1338–1342.
46. Куркин, В. А. Вопросы совершенствования стандартизации травы тысячелистника обыкновенного / В. А. Куркин, А. И. Васькова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2023. – Т. 26, № 6. – С. 17–22.
47. Курманова, Е. Н. Изучение противовоспалительной активности володушки золотистой травы экстракта сухого / Е. Н. Курманова, Е. В. Ферубко, А. И. Громакова // «Молодые ученые и фармация XXI века» : сборник научных трудов Четвертой научно-практической конференции с международным участием. – 2016. – С. 387–390.
48. Курманова, Е. Н. Гепатопротективная активность володушки золотистой при экспериментальном моделировании патологии печени / Е. Н. Курманова,



Е. В. Ферубко, Л. Б. Стрелкова [и др.]. – DOI 10.29296/25877313-2018-08-07 // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. – № 8 (21). – С. 45–51.

49. Лагунин, А. А. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ PharmExpert №2006613590 от 16.10.2006 / А. А. Лагунин, В. В. Порпойков, Д. А. Филимонов, Т. А. Глориозова. – М. : Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, 2006.

50. Ланг, Т. А. Как описывать статистику в медицине. Руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Т. А. Ланг, М. Сесик. – М. : Практическая медицина, 2011. – 480 с.

51. Лемясева, С. В. Володушка – перспективное растение для создания лекарственных средств / С. В. Лемясева, В. В. Бортникова, Т. В. Фатеева [и др.] // Материалы Международной научно-практической конференции «Planta+. Наука, практика и образование» (г. Киев, 19 февраля 2021 г.). – Киев, 2021. – С. 277–281.

52. Лубсандоржиева, П.-Н. Б. Антиоксидантная активность адаптогенного растительного средства *in vitro* / П.-Н. Б. Лубсандоржиева, С. В. Петрова, Н. Б. Болданова, Л. Н. Шантанова // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – № 4. – С. 125–127.

53. Лукашина, Т. В. Использование специфических ферментных тест-систем *in vitro* для разработки многокомпонентного препарата Стабинорм / Т. В. Лукашина, М. Ф. Минеева, Л. Б. Дубинская [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2004. – № 7. – С. 25–30.

54. Лупанова, И. А. Исследование молекулярных механизмов действия биологически активных веществ на примере тритерпеновых и флаваноидных гликозидов : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06 / Лупанова Ирина Александровна. – М., 2012. – 25 с.

55. Масесе, П. М. Разработка состава и технологии лекарственных форм с экстрактами эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill.) и эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* L. Moench.) для лечения воспалительных заболеваний

полости рта : автореф. дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.01 / Масесе Питер Мичека. – М., 2017. – 25 с.

56. Меньшикова, Е. Б. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях / Е. Б. Меньшикова, Н. К. Зенков, В. П. Реутов // Клиническая медицина. – 1997. – Т. 75, № 4. – С. 18–21.

57. Мизина, П. Г. Оценка противовоспалительной активности экспериментальных образцов лекарственных форм на основе жидких растительных экстрактов / П. Г. Мизина, Л. Б. Стрелкова, А. С. Гуленков // Биофармацевтический журнал. – 2019. – Т. 11, № 1. – С. 36–40.

58. Мизина, П. Г. Растительные и минеральные биологически активные комплексы для медицинских технологий здоровьесбережения. – М. : Наука, 2021. – 164 с.

59. Минеева, М. Ф. Физиологические основы регуляции тирозингидроксилазы / М. Ф. Минеева // Нейрохимические основы психотропного эффекта. – М. : НИИ фармакологии АМН СССР, 1982. – С. 53–63.

60. Минеева-Вялых, М. Ф. Метод прямого спектрофотометрического определения скорости тирозингидроксилазной реакции / М. Ф. Минеева-Вялых // Вопросы медицинской химии – 1976. – Т. 2 (22). – С. 274–279.

61. Мирошников, М. В. Сравнительный обзор активности ферментов системы цитохрома P450 человека и лабораторных животных / М. В. Мирошников, К. Т. Султанова, М. Н. Макарова, В. Г. Макаров. – DOI 10.18705/2311-4495-2022-9-5-44-77 // Прогностическая ценность доклинических моделей in vivo. Трансляционная медицина. – 2022. – № 5 (9). – С. 44–77.

62. Молотков, А. С. Значение пролактина в патогенезе генитального эндометриоза и возможности терапии агонистами дофамина / А. С. Молотков, М. И. Ярмолинская. – DOI 10.17116/rosakush201515642-47 // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2015. – № 6. – С. 42–47.

63. Мягчилов, А. В. Новые флавоноиды растения *Serratula coronata* L. / А. В. Мягчилов, Л. И. Соколова, П. Г. Горовой // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – Т. 2 (51). – С. 23–27.

64. Патент 2568908 Российской Федерации. Способ получения средства, обладающего антиоксидантной активностью : № 2014134311/15 : заявл. 22.08.2014 : опубл. 20.11.2015 / В. Н. Дул, Т. Д. Даргаева, А. А. Кирьянов, О. Л. Сайбель [и др.].

65. Патент № 2181890 Российская Федерация. Способ выявления веществ, обладающих адаптогенными свойствами, *in vitro* : № 2001115328 : заявл. 06.06.2001 : опубл. 27.04.2002 / Быков В. А., Дубинская В. А., Минеева М. Ф., Ребров Л. Б., Колхир В. К.

66. Патент № 2181891 Российская Федерация. Способ выявления веществ, обладающих противомикробными и противовирусными свойствами, *in vitro* : № 2001115329/14 : заявл. 06.06.2001 : опубл. 27.04.2002 / Быков В. А., Дубинская В. А., Минеева М. Ф., Ребров Л. Б., Колхир В. К.

67. Патент № 2181892 Российская Федерация. Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, *in vitro* : № 2001115330/14 : заявл. 06.06.2001 : опубл. 27.04.2002 / Быков В. А., Дубинская В. А., Минеева М. Ф., Ребров Л. Б., Колхир В. К.

68. Патент № 2194077 Российская Федерация. Способ выявления веществ с потенциальной иммуномодулирующей активностью *in vitro* с применением НАДФН-оксидазной тест-системы : № 2000109140 : заявл. 14.04.2000 : опубл. 10.12.2002 / Быков В. А., Минеева М. Ф., Попова Н. Б.

69. Патент № 2316597 Российская Федерация. Способ выявления веществ антитоксических свойств биологически активных веществ : № 2006113032/13 : заявл. 19.04.2006 : опубл. 10.02.2008 / Быков В. А., Минеева М. Ф., Стрелкова Л. Б., Колхир В. К., Ребров Л. Б.

70. Патент № 2568586 Российская Федерация. Способ получения сухого экстракта володушки золотистой : № 2014122799/15: заявл. 2014.06.05: опубл. 2015.11.20 / М. А. Джавахян, Ю. С. Канунникова.

71. Патент № 2600795 Российская Федерация. Композиция растительного происхождения в виде мицеллярного раствора : 2015149516/15 : заявл. 2015.11.19 :

опубл. 2016.10.27 / П. Г. Мизина, Н. И. Сидельников, С. М. Левачев, А. В. Панов [и др.].

72. Патент № 2604133 Российская Федерация. Композиция растительного происхождения в виде липосомальной формы : 2015149513/15: заявл. 19.11.2015 : опубл. 10.12.2016 / П. Г. Мизина, Н. И. Сидельников, С. М. Левачев, А. В. Панов [и др.].

73. Патент № 2608126 Российская Федерация. Противовоспалительная композиция пролонгированного действия для лечения дыхательных путей : № 2015149515 : заявл. 2015.11.19 : опубл. 2017.01.13 / П. Г. Мизина, Н. И. Сидельников, И. Н. Зилфикаров, А. В. Леонтьев [и др.].

74. Патент № 2630977 Лечебный крем, обладающий противовоспалительным и венотонизирующим действием : № 2016119219 : заявл. 18.05.2016 : опубл. 15.09.2017 / М. А. Джавахян, Т. Д. Даргаева, В. Н. Дул, О. Л. Сайбель [и др.].

75. Патент № 2676085 Российская Федерация. Способ получения растительного средства противовоспалительного и антимикробного действия : № 2018109888: заявл. 21.03.2018: опубл. 26.12.2018 / П. Г. Мизина, Н. И. Сидельников, [и др.].

76. Патент № 2710270 Российская Федерация. Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью и способ его получения : №2019125854 : заявл. 16.08.2019 : опубл. 25.12.2019 / О. Л. Сайбель, Т. Д. Даргаева, А. И. Радимич [и др.].

77. Патент № 2771028 Российская Федерация. Способ получения средства, обладающего гепатопротекторным и антигепатотоксическим действием : № 2020143146 : заявл. 25.12.2020 : опубл. 25.04.2022 / Сайбель О. Л., Даргаева Т. Д., Мизина П. Г., Лупанова И. А. [и др.].

78. Поройков, В. В. Компьютерное моделирование лекарств: от поиска новых фармакологических веществ до системной фармакологии / В. В. Поройков. – DOI 10.18097/PBMS20206601030 // Биомедицинская химия. – 2020. – № 1 (66). – С. 30–41.

79. Об утверждении Методических указаний по бухгалтерскому учету материально-производственных запасов : Приказ Минфина России от 28.12.2001

№ 119н (ред. от 24.10.2016) : зарегистрировано в Минюсте России 13.02.2002 № 3245. – URL: [http://www.consultant.ru/document/cons\\_doc\\_LAW\\_35543/](http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_35543/).

80. Промышленная фармация. Путь создания продукта / под ред. А. Л. Хохлова, Н. В. Пятигоркой. – М. : Российская академия наук, 2019. – 394 с.

81. Радимич, А. И. Изучение экистероидов травы серпухи венценосной (*Serratula Coronata* L.) / А. И. Радимич, В. И. Шейченко, О. Ю. Куляк [и др.] // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2020. – № 4 (30). – С. 34–42.

82. Рогов, А. В. Растительные пептиды – перспективный источник создания лекарственных средств / А. В. Рогов, М. Ф. Минеева, В. К. Колхир, Т. А. Сокольская // Фармация. – 2003. – № 6. – С. 41–43.

83. Рогожникова, Е. П. Влияние экстрагента разной концентрации на содержание биологически активных веществ в лекарственном препарате «пустырника настойка» / Е. П. Рогожникова, П. Г. Мизина, С. Г. Марданлы // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2020. – Т. 9, № 4. – С. 72–78.

84. Рогожникова, Е. П. Совершенствование технологии получения настоек из разного вида лекарственного растительного сырья : автореф. дис. ... канд. фарм. наук : 3.4.1 / Рогожникова Елена Петровна. – М., 2021. – 25 с.

85. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / под ред. Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачев. – М. : Профиль, 2010. – 358 с.

86. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А. Н. Миронова. – М. : Гриф и К, 2012. – 944 с.

87. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Издание 2-е, переработанное и дополненное. – М. : Медицина, 2005. – 832 с.

88. Савина, Т. А. оптимизация условий выращивания суспензионной культуры родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.) / Т. А. Савина, С. Б. Мясникова, М. В. Балакина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2016. – № 9 (19). – С. 13–18.

89. Сагарадзе, В. А. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве володушки золотистой / В. А. Сагарадзе, О. Л. Сайбель, М. А. Джавахян // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2016. – № 2 (12). – С. 35–39.

90. Сайбель, О. Л. Сравнительное фитохимическое изучение надземной части дикорастущего и культивируемого растения цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) / О. Л. Сайбель, А. И. Радимич, Г. В. Адамов, Т. Д. Даргаева. – DOI 10.14258/jcprtm.2020037386 // Химия растительного сырья. – 2020. – № 3. – С. 187–195.

91. Скакун, Н. П. Сравнительное действие атропина и метацина на внешнесекреторную функцию печени / Н. П. Скакун, А. Н. Олейник // Фармакология и токсикология. – 1967. – Т. 30, № 3. – С. 334–337.

92. Смирнов, В. В. Определение активности ферментов метаболизма лекарственных средств – перспектива использования в клинической практике / В. В. Смирнов // Ведомости НЦЭСМП. – 2016. – № 4. – С. 28–32.

93. Смирнова, Ю. А. Новые виды лекарственных растений для отечественной фармакопеи / Ю. А. Смирнова // Фармация. – 2009. – № 7. – С. 6–9.

94. Сосунов, А. А. Оксид азота как межклеточный посредник / А. А. Сосунов // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, №12. – С. 49–55.

95. Стрелкова, Л. Б. Индуцибельная NO-синтаза как ферментная биотест-система для выявления веществ с противовоспалительными свойствами *in vitro* / Л. Б. Стрелкова, Н. В. Кондакова, В. А. Дубинская, В. А. Быков // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 11. – С. 75–80.

96. Торшин, И. Ю. Систематический анализ состава и механизмов молекулярного воздействия стандартизированных экстрактов *Vitex agnus-castus* / И. Ю. Торшин, О. А. Громова, О. А. Лиманова // Трудный пациент. – 2015. – Т. 13, № 1–2. – С. 19–28.

97. Об обращении лекарственных средств : Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (с изменениями и дополнениями). – URL: <http://base.garant.ru/12174909/>.

98. Ферубко, Е. В. Исследование фармакологической активности винограда листьев красных экстракта сухого (*Vitis vinifera* L.) / Е. В. Ферубко, Т. Е. Лескова, В. К. Колхир, В. Н. Дул, Н. И. Сидельников // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. – № 3(20). – С. 156–159.

99. Филимонов, Д. А. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ PASS № 2006613275 от 15.09.2006 / Д. А. Филимонов, В. В. Поройков, Т. А. Глориозова, А. А. Лагунин. – М. : Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, 2006.

100. Шустов, Е. Б. От исследований *in vivo* и *in vitro* к методам *in silico* / Е. Б. Шустов // Вестник образования и развития науки Российской академии естественных наук. – 2016. – № 2 (20). – С. 91–96.

101. Adamov, G. V. Vitex agnus-castus: botanical features and area, chemical composition of fruit, pharmacological properties, and medicinal uses / G. V. Adamov, T. D. Rendyuk, O. L. Saybel [et al.] // Journal of Applied Pharmaceutical Science. – 2022. – № 3 (12) – P. 34–44.

102. Adnan, M. Intervention in Neuropsychiatric Disorders by Suppressing Inflammatory and Oxidative Stress Signal and Exploration of In Silico Studies for Potential Lead Compounds from *Holigarna caustica* (Dennst.) Oken leaves / M. Adnan, M. N. U. Chy, A. T. M. M. Kamal [et al.]. – DOI 10.3390/biom10040561 // Biomolecules. – 2020. – № 4 (10). – P. 561.

103. Agarwal, A. Use of *in vitro* bioassays for assessing botanicals / A. Agarwal, P. D'Souza, T. S. Johnson [et al.]. – DOI 10.1016/j.copbio.2013.08.010 // Current Opinion in Biotechnology. – 2014. – № 25. – P. 39–44.

104. Ahmad, S. S. Biocomputational Screening of Natural Compounds against Acetylcholinesterase / S. S. Ahmad, M. B. Khan, K. Ahmad [et al.]. – DOI 10.3390/molecules26092641 // Molecules. – 2021. – № 9 (26). – P. 2641.

105. Akter, R. A. Comprehensive Analysis into the Therapeutic Application of Natural Products as SIRT6 Modulators in Alzheimer's Disease, Aging, Cancer, Inflammation, and Diabetes / R. Akter, A. Afrose, R. Rahman, R. Chowdhury. – DOI

10.3390/ijms22084180 // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – № 8 (22). – P. 4180.

106. Alderton, W. K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition / W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles // Biochemical Journal. – 2001. – № 357. – P. 593–615.

107. Alqahtani, S. Experimental models for predicting drug absorption and metabolism / S. Alqahtani, L. A. Mohamed, A. Kaddoumi. – DOI 10.1517/17425255.2013.802772 // Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. – 2013. – № 9 (10). – P. 1241–1254.

108. Ambriz-Perez, D. L. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A review / D. L. Ambriz-Perez, N. Leyva-Lopez [et al.] // Cogent Food & Agriculture – 2016. – Vol. 2. – P. 1–14.

109. Annis, D. A. Affinityselection-mass spectrometry screening techniques for small molecule drugdiscovery / D. A. Annis, E. Nickbarg, X. Yang [et al.]. – DOI 10.1016/j.cbpa.2007.07.011 // Current Opinion in Chemical Biology. – 2007. – V. 11. – P. 518–526.

110. Anzenbacher, P. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics / P. Anzenbacher, E. Anzenbacherová // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2001. – № 58. – P. 737–747.

111. Ashour, M. L. Genus Bupleurum: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action / M. L. Ashour, M. Wink. – DOI 10.1111/j.2042-7158.2010.01170.x // Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2011. – № 3 (63). – P. 305–321.

112. Asyakina, L. Determination of the Qualitative Composition of Biologically-Active Substances of Extracts of In Vitro Callus, Cell Suspension, and Root Cultures of the Medicinal Plant *Rhodiola rosea* / L. Asyakina, S. Sukhikh, S. Ivanova [et al.]. – DOI 10.3390/biom11030365A // Biomolecules. – 2021. – № 11. – P. 365.

113. Atanasov, A. G. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review / A. G. Atanasov, B. Waltenberger, E.-M. Pferschy-Wenzig, T. Linder. – DOI 10.1016/j.biotechadv.2015.08.001 // Biotechnology Advances. – 2015. – № 8 (33). – P. 1582–1614.



114. Atanasov, A. G. Natural products in drug discovery: advances and opportunities / A. G. Atanasov, S. B. Zotchev, V. M. Dirsch, C. T. Supuran. – DOI 10.1038/s41573-020-00114-z // *Nature reviews*. – 2021. – Vol. 20. – P. 200–216.
115. Aziz, A. The role of microfluidics for organ on chip simulations / A. Aziz, C. Geng, M. Fu [et al.]. – DOI 10.3390/bioengineering4020039 // *Bioengineering*. – 2017. – Vol. 4, № 2. – P. 39–53.
116. Balunas, M. J. Interference by naturally occurring fatty acids in a noncellular enzyme-based aromatase bioassay / M. J. Balunas, B. Su, S. Landini, R. W. Brueggemeier, A. D. Kinghorn. – DOI 10.1021/np050513p // *Journal of Natural Products*. – 2006. – № 69. – P. 700–703.
117. Baptista, R. Molecular Docking Suggests the Targets of Anti-Mycobacterial Natural Products / R. Baptista, S. Bhowmick, J. Shen, L. A. J. Mur. – DOI 10.3390/molecules26020475 // *Molecules*. – 2021. – № 2 (26). – P. 475.
118. Bates, D. O. Pharmacology of Modulators of Alternative Splicing / D. O. Bates, J. C. Morris, S. Oltean, L. F. Donaldson. – DOI 10.1124/pr.115.011239 // *Pharmacological Reviews*. – 2017. – № 1 (69). – P. 63–79.
119. Bebiana, C. S. Short-chain lipid peroxidation products form covalent adducts with pyruvate kinase and inhibit its activity in vitro and in breast cancer cells / C. S. Bebiana, A. Tanzim, W. L. Dann [et al.]. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.028 // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2019. – № 144. – P. 223–233.
120. Beuter, E. Red cell enzyme defects / E. Beuter // *Hematologic Pathology*. – 1990. – № 3 (4). – P. 103–114.
121. Bocharova, O. A. A Potential Method for Standardization of Multiphytoadaptogen: Tandem Mass Spectrometry for Analysis of Biologically Active Substances from *Rhodiola rosea* / O. A. Bocharova, I. V. Kazeev, V. E. Shevchenko [et al.]. – DOI 10.1007/s11094-022-02607-0 // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2022. – № 56. – P. 78–84.
122. Bohr, C. Inkulturnahme von bisher aus Wildsammlungen stammenden Wirkstoffpflanzen / C. Bohr // *Drogenreport*. – 1997. – № 10. – P. 37–39.

123. Bortnikova, V. V. A perspective botanical drug: Hepatoprotective activity of dry extract prepared from the aerial part of chicory plant (*Cichorium intybus* L.) / V. V. Bortnikova, L. V. Krepkova, A. N. Babenko [et al.]. – DOI 10.1002/cpdd.1004 // Clinical pharmacology in drug development. Abstracts: 2021, The American College of Clinical Pharmacology®. – 2021 September 15. – № 10 (S1). – P. 100–101.

124. Bueno-Carrasco, M. T. Structural mechanism for tyrosine hydroxylase inhibition by dopamine and reactivation by Ser40 phosphorylation / M. T. Bueno-Carrasco, J. Cuellar, C. Santiago [et al.]. – DOI 10.1038/s41467-021-27657-y // Nature Communications. – 2022. – № 13. – P. 74.

125. Buko, V. Chlorogenic Acid Protects against Advanced Alcoholic Steatohepatitis in Rats via Modulation of Redox Homeostasis, Inflammation, and Lipogenesis / V. Buko, I. Zavodnik, G. Budryn [et al.]. – DOI 10.3390/nu13114155 // Nutrients. – 2021. – № 11 (13). – P. 4155.

126. Butler, M. S. Natural product libraries: assembly, maintenance, and screening / M. S. Butler, F. Fontaine, M. A. Cooper. – DOI 10.1055/s-0033-1360109 // Planta Medica. – 2014. – V. 80. – P. 1161–1170.

127. Butterweck, V. What is the best strategy for preclinical testing of botanicals? A critical perspective / V. Butterweck, A. Nahrstedt. – DOI 10.1055/s-0031-1298434 // Planta Medica. – 2012. – № 8 (78). – P. 747–754.

128. Canter, P. H. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology / P. H. Canter, H. Thomas, E. Ernst. – DOI 10.1016/j.tibtech.2005.02.002 // Trends in Biotechnology. – 2005. – № 23. – P. 180–185.

129. Chen, H.-W. Review Article Chemical Components and Cardiovascular Activities of Valeriana spp / H.-W. Chen, B.-J. Wei, X.-H. He [et al.] // Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume. – 2015. – P. 1–11.

130. Chen, L. Prediction of anti-tumor chemical probes of a traditional Chinese medicine formula by HPLC fingerprinting combined with molecular docking / L. Chen, J. Du, Q. Dai, H. Zhang [et al.]. – DOI 10.1016/j.ejmech.2014.06.037 // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2014. – № 83. – P. 294–306.

131. Chervinets, V. M. The microbiome of oral cavity patients with periodontitis, adhesive and biofilm forming properties / V. M. Chervinets, Yu. V. Chervinets, A. V. Leont'eva [et al.]. – DOI 10.18821/0869-2084-2021-66-1-45-51 // *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. – 2021. – № 1 (66). – P. 45–51.
132. Chkhikvishvili, I. Study of resveratrol and antioxidant activity in Georgian brand red wines and a number of foreign red wines / I. Chkhikvishvili, N. Gogia, G. Sirbiladze // *Georgian Medical News*. – 2008. – V. 159. – P. 53–57.
133. Ciemny, M. Protein-peptide docking: opportunities and challenges / M. Ciemny, M. Kurcinski, K. Kamel [et al.]. – DOI 10.1016/j.drudis.2018.05.006 // *Drug Discovery Today*. – 2018. – № 23. – P. 1530–1537.
134. Coan, K. E. Non-stoichiometric inhibition in biochemical high-throughput screening / K. E. Coan, J. Ottl, M. Klumpp. – DOI 10.1517/17460441.2011.561309 // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2011. – № 6. – P. 405–417.
135. Cohen, P. Kinase drug discovery – what's next in the field? / P. Cohen, D. R. Alessi. – DOI 10.1021/cb300610s // *ACS Chemical Biology*. – 2013. – № 1 (8). – P. 96–104.
136. Collins, R. A. Removal of polyphenolic compounds from aqueous plant extracts using polyamide minicolumns / R. A. Collins, T. B. Ng, W. P. Fong [et al.]. – DOI 10.1080/15216549800203212 // *Biochemistry and Molecular Biology International*. – 1998. – № 5. – P. 791–796.
137. Cordell, G. A. Sustainable medicines and global health care / G. A. Cordell. – DOI 10.1055/s-0030-1270731 // *Planta Medica*. – 2011. – № 77. – P. 1129–1138.
138. Costa, R. A. Vibrational, structural and electronic properties investigation by DFT calculations and molecular docking studies with DNA topoisomerase II of strychnobrasiline type alkaloids: A theoretical approach for potentially bioactive molecules / R. A. Costa, K. M. T. Oliveira, E. V. Costa, M. L. B. Pinheiro // *Journal of Molecular Structure*. – 2017. – V. 1145. – P. 254–267.
139. Couto, N. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network / N. Couto, J. Wood, J. Barber. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028 // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2016. – № 95. – P. 27–42.

140. Da Silva, R. R. Propagating annotations of molecular networks using *in silico* fragmentation / R. R. da Silva, M. Wang, L.-F. Nothias [et al.] // PLOS Computational Biology. – 2018. – № 4 (14). – P. e1006089.

141. Daga, P. R. Structure-based virtual screening of the nociceptin receptor: hybrid docking and shape-based approaches for improved hit identification / P. R. Daga, W. E. Polgar, N. T. Zaveri. – DOI 10.1021/ci500291a // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2014. – № 10 (54). – P. 2732–2743.

142. Dalby, A. Description of several chemical structure file formats used by computer programs developed at Molecular Design Limited / A. Dalby, J. G. Nourse, E. D. Hounshell [et al.]. – DOI 10.1021/ci00007a012 // Journal of Chemical Information and Computer Sciences. – 1992. – № 3 (32). – P. 244–255.

143. Daniels, R. H. Priming of the oxidative burst in human neutrophils by physiological agonists or cytochalasin B results from the recruitment of previously non-responsive cells / R. H. Daniels, M. A. Elmore, M. E. Hill [et al.] // Immunology. – 1994. – № 4. – P. 465–472.

144. Das, N. The phytochemical, biological, and medicinal attributes of phytoecdysteroids: An updated review / N. Das, S. K. Mishra, A. Bishayee, E. S. Ali [et al.]. – DOI 10.1016/j.apsb.2020.10.012 // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2021. – № 7 (11). – P. 1740–1766.

145. De Sousa Luis, J. A. Virtual Screening of Natural Products Database / J. A. de Sousa Luis, R. P. Costa Barros, N. F. de Sousa [et al.]. – DOI 10.2174/1389557520666200730161549 // Mini Reviews in Medicinal Chemistry. – 2021. – № 18 (21). – P. 2657–2730.

146. Dinan, L. The Karlson Lecture. Phytoecdysteroids: what use are they? / L. Dinan // Archives of Insect Biochemistry and Physiology. – 2009. – № 72. – P. 126–141.

147. Domitrovic, R. Comprehensive overview of hepatoprotective natural compounds: mechanism of action and clinical perspectives / R. Domitrovic, I. A. Potocnjak. – DOI 10.1007/s00204-015-1580-z // Archives of toxicology. – 2016. – № 1 (90). – P. 39–79.

148. Eberhardt, J. AutoDock Vina 1.2.0: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings / J. Eberhardt, D. Santos-Martins, A. F. Tillack, S. Forli. – DOI 10.1021/acs.jcim.1c00203 // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2021. – № 8 (61). – P. 3891–3898.
149. Eddershaw, P. J. ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery / P. J. Eddershaw, A. P. Beresford, M. K. Bayliss. – DOI 10.1016/s1359-6446(00)01540-3 // Drug Discovery Today. – 2000. – № 5 (9). P. 409–414.
150. Eisenberg, D. M. Developing a library of authenticated Traditional Chinese Medicinal (TCM) plants for systematic biological evaluation – rationale, methods and preliminary results from a Sino-American collaboration / D. M. Eisenberg, E. S. J. Harris, B. A. Littlefield, S. Cao [et al.]. – DOI 10.1016/j.fitote.2010.11.017 // Fitoterapia. – 2011. – № 1 (82). – P. 17–33.
151. Elgorashi, E. E. Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species / E. E. Elgorashi, J. van Staden. – DOI 10.1016/j.jep.2003.09.012 // Journal of Ethnopharmacology. – 2004. – № 1 (90). – P. 27–32.
152. Entzeroth, M. Overview of high-throughput screening / M. Entzeroth, H. Flotow, P. Condrón. – DOI 10.1002/0471141755.ph0904s44 // Current Protocols in Pharmacology. – 2009. – № 44. – P. 9.4.1–9.4.27.
153. Epure, A. Phytochemical profile, antioxidant, cardioprotective and nephroprotective activity of romanian chicory extract / A. Epure, A. E. Pârvu, L. Vlase [et al.]. – DOI 10.3390/plants10010064 // Plants. – 2021. – № 10. – P. 64.
154. Falzon, C. C. Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine / C. C. Falzon, A. Balabanova. – DOI 10.1016/j.pop.2017.02.001 // Primary care respiratory journal. – 2017. – № 2 (44). – P. 217–227.
155. Feher, M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry / M. Feher, J. M. Schmidt. – DOI 10.1021/ci0200467 // Journal of Chemical Information and Computer Sciences. – 2003. – № 43. – P. 218–227.
156. Fernando, D. R. Multiple metal accumulation within a manganese-specific genus / D. R. Fernando Multiple metal accumulation within a manganese-specific genus /

D. R. Fernando, A. T. Marshall, P. I. Forster [et al.]. – DOI 10.3732/ajb.1200545 // American Journal of Botany. – 2013. – № 4 (100). – P. 690–700.

157. Filimonov, D. A. Chemical similarity assessment through multilevel neighborhoods of atoms: definition and comparison with the other descriptors / D. Filimonov, V. Poroikov, Yu. Borodina, T. Glorizova. – DOI 10.1021/ci980335o // Journal of Chemical Information and Computational Sciences. – 1999. – № 4 (39). – P. 666–670.

158. Filimonov, D. A. Computer-aided Prediction of Biological Activity Spectra for Chemical Compounds: Opportunities and Limitations / D. A. Filimonov, D. S. Druzhilovskiy, A. A. Lagunin [et al.] // Biomedical Chemistry: Research and Methods. – 2018. – № 1 (1). – P. e00004.

159. Fishmann, T. O. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation / T. O. Fishman, A. Hruza, X. D. Niu [et al.]. – DOI 10.1038/6675 // Nature structural biology. – 1999. – Vol. 6, N 3. – P. 233–242.

160. Forli, S. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite / S. Forli, R. Huey, M. E. Pique [et al.]. – DOI 10.1038/nprot.2016.051 // Nature Protocols. – 2016. – № 5 (11). – P. 905–919.

161. Foroughi, L. M. The crystal structure of the P212121 form of bovine liver catalase previously characterized by electron microscopy / L. M. Foroughi, Y. N. Kang, A. J. Matzger. – DOI 10.2210/pdb3nwl/pdb // Crystal Growth & Design. – 2011. – № 11. – P. 1294–1298.

162. Foster, J. R. Chimeric rodents with humanized liver: bridging the preclinical/clinical trial gap in ADME/toxicity studies / J. R. Foster, G. Lund, S. Sapelnikova [et al.]. – DOI 10.3109/00498254.2013.867553 // Xenobiotica. – 2014. – V. 44. – P. 109–122.

163. Franco, C. I. F. CNS pharmacological effects of the hydroalcoholic extract of *Sida cordifolia* L. leaves / C. I. F. Franco, L. C. S. L. Morais, L. J. Quintans-Júnior [et al.]. – DOI 10.1016/j.jep.2005.01.008 // Journal of Ethnopharmacology. – 2005. – № 3 (98). – P. 275–279.

164. Fu, Y. Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products / Y. Fu, J. Luo, J. Qin, M. Yang. – DOI 10.1016/j.jpba.2019.02.027 // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2019. – № 168. – P. 189–200.



165. Gao, B. Platelet P2Y<sub>1/2</sub> receptors are involved in the haemostatic effect of notoginsenoside Ft1, a saponin isolated from *Panax notoginseng* / B. Gao, L. Huang, H. Liu [et al.]. – DOI 10.1111/bph.12435 // *British Journal of Pharmacology*. – 2014. – № 1 (171). – P. 214–23.
166. Gaulton, A. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery / A. Gaulton, L. J. Bellis, A. P. Bento [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – № 40. – P. D1100–D1107.
167. Gavernet, L. A Combined Virtual Screening 2D and 3D QSAR Methodology for the Selection of New Anticonvulsant Candidates from a Natural Product Library / L. Gavernet, A. Talevi, E. A. Castro, L. E. Bruno-Blanch. – DOI 10.1002/qsar.200730055 // *QSAR & Combinatorial Science*. – 2008. – № 9 (27). – P. 1120–1129.
168. Gawande, D. Y. Pharmacological validation of in-silico guided novel nootropic potential of *Achyranthes aspera* L. / D. Y. Gawande, R. K. Goel. – DOI 10.1016/j.jep.2015.09.025 // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2015. – № 175. – P. 324–334.
169. Gill, B. S. *Vitex negundo* and its medicinal value / B. S. Gill, R. Mehra, Navgeet, S. Kumar. – DOI 10.1007/s11033-018-4421-3 // *Molecular Biology Reports*. – 2018. – № 6 (45). – P. 2925–2934.
170. Gimeno, A. The Light and Dark Sides of Virtual Screening: What Is There to Know? / A. Gimeno, M. J. Ojeda-Montes, S. Tomás-Hernández [et al.]. – DOI 10.3390/ijms20061375 // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – № 6 (20). – P. 1375.
171. Glorieux, C. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach / C. Glorieux, P. B. Calderon. – DOI 10.1515/hsz-2017-0131 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – № 10 (398). – P. 1095–1108.
172. Goel, R. K. Pharmacological repositioning of *Achyranthes aspera* as an antidepressant using pharmacoinformatic tools PASS and PharmaExpert: a case study with wet lab validation. / R. K. Goel, D. Y. Gawande, A. A. Lagunin, V. V. Poroikov // *SAR and QSAR in Environmental Research*. – 2018. – № 1 (29). – P. 69–81.

173. Goyal M. M. Human catalase: looking for complete identity / M. M. Goyal, A. Basak. – DOI 10.1007/s13238-010-0113-z // *Protein & Cell*. – 2010. – № 1 (10). – P. 888–897.
174. Gul, S. Exemplification of the challenges associated with utilizing fluorescence intensity based assays in discovery / S. Gul, P. Gribbon. – DOI 10.1517/17460441.2010.495748 // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2010. – № 5. – P. 681–690.
175. Gupta, M. Docking techniques in pharmacology: How much promising? / M. Gupta, R. Sharma, A. Kumar. – DOI 10.1016/j.compbiolchem.2018.06.005 // *Computational Biology and Chemistry*. – 2018. – № 76. – P. 210–217.
176. Habib, S. *In silico*, *in-vitro* and *in vivo* screening of biological activities of citral / S. Habib, P. Gupta, S. S. Bhat, J. Gupta. – DOI 10.1024/0300-9831/a000625 // *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. – 2021. – № 91 (3–4). – P. 251–260.
177. Habig, W. H. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. / W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1974. – № 22 (249). – P. 7130–7139.
178. Hammer, H. Cross-species analysis of hepatic cytochrome P450 and transport protein expression / H. Hammer, F. Schmidt, P. Marx-Stoelting [et al.]. – DOI 10.1007/s00204-020-02939-4 // *Archives of Toxicology*. – 2021. – № 1 (95). – P. 117–133.
179. Han, K. Prediction methods of herbal compounds in chinese medicinal herbs / K. Han, L. Zhang, M. Wang [et al.]. – DOI 10.3390/molecules23092303 // *Molecules*. – 2018. – № 23. – P. 2303.
180. Hein, M. Docking compared to 3D-pharmacophores: the scoring function challenge / M. Hein, D. Zilian, C. A. Sotriffer // *Drug Discovery Today Technologies*. – 2010. – № 7. – P. e229–e236.
181. Henrich, C. J. Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products / C. J. Henrich, J. A. Beutler. – DOI 10.1039/c3np70052f // *Natural Product Reports*. – 2013. – № 30. – P. 1284–1298.
182. Hermann, J. C. Metal impurities cause false positives in high-throughput screening campaigns / J. C. Hermann, Y. Chen, C. Wartchow [et al.]. – DOI 10.1021/ml3003296 // *ACS Medicinal Chemistry Letters*. – 2013. – № 4. – P. 197–200.



183. Hoffmann, T. The next level in chemical space navigation: going far beyond enumerable compound libraries / T. Hoffmann, M. Gastreich. – DOI 10.1016/j.drudis.2019.02.013 // *Drug Discovery Today*. – 2019. – V. 24, No. 5. – P. 1148–1156.
184. Holm, P. J. The 3-D structure of microsomal glutathione transferase 1 at 6 Å resolution as determined by electron crystallography of p22(1)2(1) crystals / P. J. Holm, R. Morgenstern, H. Hebert. – DOI 10.1016/S0167-4838(01)00311-9 // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2002. – № 2 (1594). – P. 276–285.
185. Höltje, H. D. *Molecular Modeling – Basic Principles and Applications* / H. D. Höltje, G. Folkers, R. Mannhold [et al.]. – Weinheim : Wiley-VCH, 2008. – 310 p.
186. Hong, M. Screening of immunomodulatory components in Yu-ping-feng-san using splenocytebinding and HPLC / M. Hong, X. Z. Wang, L. Wang [et al.]. – DOI 10.1016/j.jpba.2010.08.016 // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2011. – № 54. – P. 87–93.
187. Hopkins, A. L. Network pharmacology / A. L. Hopkins // *Nature Biotechnology*. – 2007. – V. 25. – P. 1110–1111.
188. Hsu, K.-D. Tyrosinase-based TLC Autography for anti-melanogenic drug screening / K.-D. Hsu, Y.-H. Chan, H.-J. Chen [et al.]. – DOI 10.1038/s41598-017-18720-0 // *Scientific Reports*. – 2018. – № 1 (8). – P. 401.
189. Huang, P. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs / P. Huang, A. Xiao, M. Zhou [et al.]. – DOI 10.1038/nbt.1939 // *Nature Biotechnology*. – 2011. – № 8 (29). – P. 699–700.
190. Huang, W. Meclizine is an agonist ligand for mouse constitutive androstane receptor (CAR) and an inverse agonist for human CAR / W. Huang, J. Zhang, P. Wei [et al.]. – DOI 10.1210/me.2004-0046 // *Molecular Endocrinology*. – 2004. – № 10 (18). – P. 2402–2408.
191. Hussein, O. E. Chicoric acid prevents methotrexate hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and inflammation and up-regulation of PPAR $\gamma$  and Nrf2/HO-1 signaling / O. E. Hussein, W. G. Hozayen, M. N. Bin-Jumah [et al.]. – DOI 10.1007/s11356-020-08557-y // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2020. – V. 27. – P. 20725–20735.

192. Ionov, N. S. Possibilities of *in Silico* Estimations for the Development of the Pharmaceutical Composition Phytoladptogene Cytotoxic for Bladder Cancer Cells / N. S. Ionov, M. A. Baryshnikova, E. V. Bocharov [et al.]. – DOI 10.1134/S1990750821040041 // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B Biomedical Chemistry. – 2021. – № 15. – P. 290–300.
193. Israelsen, W. J. Pyruvate kinase: Function, regulation and role in cancer / W. J. Israelsen, M. G. Vander Heiden. – DOI 10.1016/j.semcd.2015.08.004 // Seminars in Cell and Developmental Biology. – 2015. – № 43. – P. 43–51.
194. Iwai, K. Inhibitory effects of *viburnum dilatatum* Thunb. (*gamazumi*) on oxidation and hyperglycemia in rats with streptozotocin-induced diabetes / K. Iwai, A. Onodera, H. Matsue. – DOI 10.1021/jf0302557 // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2004. – № 4 (52). – P. 1002–1007.
195. Jamshidzadeh, A. Hepatoprotective Activity of *Cichorium intybus* L. leaves extract against carbon tetrachloride induced toxicity / A. Jamshidzadeh, M. J. Khoshnood, Z. Dehghani, H. Niknahad. – DOI 10.22037/IJPR.2010.651 // Iranian Journal of Pharmaceutical Research. – 2006. – № 1. – P. 41–46.
196. Janda, K. The Common Cichory (*Cichorium intybus* L.) as a Source of Extracts with Health-Promoting Properties-A Review / K. Janda, I. Gutowska, M. Geszke-Moritz, K. Jakubczyk. – DOI 10.3390/molecules26061814 // Molecules. – 2021. – № 6 (26). – P. 1814.
197. Jaroch, K. Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable *in vitro-in vivo* extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment / K. Jaroch, A. Jaroch, B. Bojko. – DOI 10.1016/j.jpba.2017.07.023 // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2018. – V. 147. – P. 297–312.
198. Jasim, R. S. Antioxidant, antimicrobial activities and phytochemical constituents of *Cichorium intybus* L. / R. S. Jasim // Aerial. Parts. Int. J. Bot. – 2018. – № 14. – P. 24–29.
199. Jiao, X. A comprehensive application: Molecular docking and network pharmacology for the prediction of bioactive constituents and elucidation of mechanisms of action in component-based Chinese medicine / X. Jiao, X. Jin, Y. Ma [et al.]. – DOI

10.1016/j.combiolchem.2020.107402 // Computational biology and chemistry. – 2021. – № 90. – P. 107402.

200. Johnson, T. A. Natural product libraries to accelerate the high-throughput discovery of therapeutic leads / T. A. Johnson, J. Sohn, W. D. Inman [et al.]. – DOI 10.1021/np200673b / Journal of Natural Products. – 2011. – № 74. – P. 2545–2555.

201. Kabir, M. S. H. Antioxidant, antidiarrheal, hypoglycemic and thrombolytic activities of organic and aqueous extracts of *Hopea odorata* leaves and in silico PASS prediction of its isolated compounds / M. S. H. Kabir, M. M. Hossain, I. Kabir [et al.]. – DOI 10.1186/s12906-016-1461-x // BMC Complementary Medicine and Therapies. – 2016. – № 1 (16). – P. 474.

202. Karasev, D. A. Prediction of Protein–ligand Interaction Based on Sequence Similarity and Ligand Structural Features / D. A. Karasev, B. N. Sobolev, A. A. Lagunin [et al.]. – DOI 10.3390/ijms21218152 // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – № 21. – P. 8152.

203. Karimi, M. H. The effects of cichorium intybus extract on the maturation and activity of dendritic cells / M. H. Karimi, S. Ebrahimnezhad, M. Namayandeh, Z. Amirghofran. – DOI 10.1186/2008-2231-22-28 // DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2014. – № 1 (22). – P. 28.

204. Kervinen, J. Potency variation of small-molecule chymase inhibitors across species / J. Kervinen, C. Crysler, S. Bayoumy [et al.]. – DOI 10.1016/j.bcp.2010.06.014 // Biochemical Pharmacology. – 2010. – № 7 (80). – P. 1033–1041.

205. Kim, H. Antioxidant activity and total phenolic contents of three *Bupleurum* taxa / H. Kim, S. H. Kim, K. W. Yun // Natural Product Communications. – 2014. – № 4 (9). – P. 523–524.

206. Kim, J. H. Effects of the ethanol extract of *Cichorium intybus* on the immunotoxicity by ethanol in mice / J. H. Kim, Y. J. Mun, W. H. Woo [et al.]. – DOI 10.1016/s1567-5769(02)00008-5 // International Immunopharmacology. – 2002. – № 2 (6). – P. 733–744.

207. Kitchen, D. B. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications / D. B. Kitchen, H. Decornez, J. R. Furr, J. Bajorath. – DOI 10.1038/nrd1549 // Nature Reviews Drug Discovery. – 2004. – № 3 (11). – P. 935–949.
208. Knight, T. R. Induction of hepatic glutathione S-transferases in male mice by prototypes of various classes of microsomal enzyme inducers / T. R. Knight, S. Choudhuri, C. D. Klaassen. – DOI 10.1093/toxsci/kfn179 // Toxicological Sciences. – 2008. – № 2 (106). – P. 329–338.
209. Koehn, F. E. The evolving role of natural products in drug discovery / F. E. Koehn, G. T. Carter // Nature Reviews Drug Discovery. – 2005. – № 4. – P. 206–220.
210. Kour, K. Chicoric acid regulates behavioral and biochemical alterations induced by chronic stress in experimental Swiss albino mice / K. Kour, S. Bani. – DOI 10.1016/j.pbb.2011.05.008 // Pharmacology Biochemistry and Behavior. – 2011. – № 3 (99). – P. 342–348.
211. Kroma, A. Phytoecdysteroids from *Serratula coronata* L. for Psoriatic Skin-care / A. Kroma, M. Pawlaczyk, A. Feliczak-Guzik [et al.]. – DOI 10.3390/molecules27113471 // Molecules. – 2022. – № 11 (27). – P. 3471.
212. Lagunin, A. A. Antihypoxic Action of *Panax Japonicus*, *Tribulus Terrestris* and *Dioscorea Deltoidea* Cell Cultures: *In Silico* and Animal Studies / A. Lagunin, M. Povydysh, D. Ivkin, V. Luzhanin [et al.]. – DOI 10.1002/minf.202000093 // Molecular Informatics. – 2020. – № 11 (39). – P. e2000093.
213. Lagunin, A. A. Chemo-and bioinformatics resources for in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review / A. A. Lagunin, R. K. Goel, D. Y. Gawande [et al.]. – DOI 10.1039/C4NP00068D // Natural Product Reports. – 2014. – № 11 (31). – P. 1585–1611.
214. Lam, P. Hepatoprotective Effects of Chinese Medicinal Herbs: A Focus on Anti-Inflammatory and Anti-Oxidative Activities / P. Lam, F. Cheung, H. Y. Tan. – DOI 10.3390/ijms17040465 // International Journal of Molecular Sciences. – 2016. – № 4 (17). – P. 465.

215. Landmann, M. Oral intake of chicoric acid reduces acute alcohol-induced hepatic steatosis in mice / M. Landmann, G. Kanuri, A. Spruss [et al.]. – DOI 10.1016/j.nut.2013.11.015 // *Nutrition*. – 2014. – № 30 (7–8). – P. 882–889.
216. Lankatillake, C. Screening natural product extracts for potential enzyme inhibitors: protocols, and the standardisation of the usage of blanks in  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase assays / C. Lankatillake, S. Luo, M. Flavel [et al.]. – DOI 10.1186/s13007-020-00702-5 // *Plant Methods*. – 2021. – № 1 (17). – P. 3.
217. Levy, C. Use of herbal supplements for chronic liver disease / C. Levy, L. D. Seeff, K. D. Lindor. – DOI 10.1016/s1542-3565(04)00455-0 // *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. – 2004. – № 2 (11). – P. 947–956.
218. Li, P. Analysis of Chinese herbalmedicines with holistic approaches and integrated evaluation models / P. Li, L. W. Qi, E. H. Liu [et al.]. – DOI 10.1016/j.trac.2007.11.005 // *Trends in Analytical Chemistry*. – 2008. – V. 27. – P. 66–77.
219. Li, Q. PubChem as a public resource for drug discovery / Q. Li, T. Chen, Y. Wang, S. H. Bryant // *Drug Discovery Today*. – 2010. – № 15. – P. 1052–1057.
220. Liao, X. Vitamin D Enhances Neutrophil Generation and Function in Zebrafish (*Danio rerio*) / X. Liao, Y. Lan, R. Shao [et al.]. – DOI 10.1159/000519183 // *Journal of Innate Immunity*. – 2021. – P. 1–14.
221. Liddle, C. Hepatic metabolism of drugs / C. Liddle, C. Stedman // *The Textbook of Hepatology: from basic science to clinical practice*. – 2007. – P. 241–249.
222. Lipinski, C. Navigating chemical space for biology and medicine / C. Lipinski, A. Hopkins. – DOI 10.1038/nature03193 // *Nature*. – 2004. – V. 432. – P. 855–861.
223. Liu, H. Chemical constituents of *Panax ginseng* and *Panax notoginseng* explain why they differ in therapeutic efficacy / H. Liu, X. Lu, Y. Hu, X. Fan. – DOI 10.1016/j.phrs.2020 // *Pharmacological research*. – 2020. – № 161. – P. 105263105263.
224. Liu, S. Q. HepG2 cells biospecific extraction and HPLC-ESI-MS analysis for screening potential antia the rosclerotic active components in *Bupeuri radix* / S. Q. Liu, Z. B. Tan, P. T. Li [et al.]. – DOI 10.1016/j.jpba.2016.01.010 // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2016. – V. 121. – P. 56–62.

225. Liu, X. Hollow fiber cell fishing with high-performance liquid chromatography for rapid screening and analysis of an antitumor-active protoberberine alkaloid group from *Coptis chinensis* / X. Liu, S. Hu, X. Chen, X. H. Bai. – DOI 10.1016/j.jpba.2014.06.030 // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2014. – V. 98. – P. 463–475.

226. Liu, Y. Use of the Combination. Index to determine interactions between plant-derived phenolic acids on hepatotoxicity endpoints in human and rat hepatoma cells / Y. Liu, T. J. Flynn, M. S. Ferguson, E. M. Hoagland. – DOI 10.1016/j.phymed.2012.12.013 // *Phytomedicine*. – 2013. – № 20. – P. 461–468.

227. Lou, Z. C. Bioassay of a botanical laxative / Z. C. Lou // *Acta Pharmaceutica Sinica*. – 1953. – P. 49–71.

228. Lowry, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. Y. Rosenberg, A. J. Farr // *Journal of Biological Chemistry*. – 1951. – Vol. 1 (193). – P. 265–275.

229. Lu, Q. Chemical metabolism of medicinal compounds from natural botanicals / Q. Lu, J. G. Jiang. – DOI 10.2174/092986712799945076 // *Current Medicinal Chemistry*. – 2012. – V. 19. – P. 1682–1705.

230. Lui, C. Nucleic acid-based detection of bacterial pathogens using integrated microfluidic platform systems / C. Lui, N. C. Cady, C. A. Batt. – DOI 10.3390/s90503713 // *Sensors*. – 2009. – № 9. – P. 3713–3744.

231. Maes, J. Evaluation of 14 organic solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae / J. Maes, L. Verlooy, O. E. Buenafe [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0043850 // *PLoS One*. – 2012. – № 7 (10). – P. e43850.

232. Makhouri, F. R. *In Silico* Studies in Drug Research Against Neurodegenerative Diseases / F. R. Makhouri, J. B. Ghasemi. – DOI 10.2174/1570159X15666170823095628 // *Current Neuropharmacology*. – 2018. – № 6 (16). – P. 664–725.

233. Manikandan, P. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review / P. Manikandan, S. Nagini. – DOI 10.2174/1389450118666170125144557 // *Current Drug Targets*. – 2018. – № 1 (19). – P. 38–54.

234. Marchev, A. S. *Rhodiola rosea* L.: from golden root to green cell factories / A. S. Marchev, A. T. Dinkova-Kostova, Z. György [et al.]. – DOI 10.1007/s11101-016-9453-5 // *Phytochemistry Reviews*. – 2016. – № 15. – P. 515–536.

235. Matera, C. Pharmacological approaches to targeting muscarinic acetylcholine receptors / C. Matera, A. M. Tata. – DOI 10.2174/1574889809666141120131238 // *Recent Patents on CNS Drug Discovery*. – 2014. – Vol. 9. – P. 85–100.

236. Meier, B. Pharmacological activities of *Vitex agnus-castus* extracts in vitro / B. Meier, D. Berger, E. Hoberg [et al.]. – DOI 10.1016/S0944-7113(00)80058-6 // *Phytomedicine*. – 2000. – № 5 (7). – P. 373–381.

237. Miralpeix, B. Metabolic engineering of plant secondary products: which way forward? / B. Miralpeix, H. Rischer, S. T. Hakkinen [et al.] // *Current Pharmaceutical Design*. – 2013. – № 19. – P. 5622–5639.

238. Mitchell, A. E. Quantitative profiling of tissue- and gender-related expression of glutathione S-transferase isoenzymes in the mouse / A. E. Mitchell, D. Morin, J. Lakritz, A. D. Jones. – DOI 10.1042/bj3250207 // *Biochemical Journal*. – 1997. – № 325 (Pt. 1). – P. 207–216.

239. Mittal, R. Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications / R. Mittal, F. W. Woo, C. S. Castro [et al.]. – DOI 10.1002/jcp.27729 // *Journal of Cellular Physiology*. – 2019. – № 6 (234). – P. 8352–8380.

240. Mohammadifar, M. Effect of *Ziziphus jujuba* Mill., *Cichorium intybus* L. and *Silybum marianum* (L.) Gaertn. Combination Extract on Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Rats / M. Mohammadifar, M. Taghizadeh, A. Abed [et al.]. – DOI 10.29252/jmp.4.72.S12.133 // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2019. – № 18 (72). – P. 133–142.

241. Morgenstern, R. Microsomal glutathione transferase 1: mechanism and functional roles / R. Morgenstern, J. Zhang, K. Johansson. – DOI 10.3109/03602532.2011.558511 // *Drug Metabolism Reviews*. – 2011. – № 2 (43). – P. 300–306.

242. Murthy, H. N. Panax ginseng Adventitious Root Suspension Culture: Protocol for Biomass Production and Analysis of Ginsenosides by High Pressure Liquid Chromatography / H. N. Murthy, K. Y. Paek. – DOI 10.1007/978-1-4939-3332-7-9 // Methods in Molecular Biology. – 2016. – № 1391. – P. 125–139.

243. Murthy, H. N. Quality, safety and efficacy profiling of ginseng adventitious roots produced in vitro / H. N. Murthy, V. S. Dandin, S.-Y. Park [et al.]. – DOI 10.1007/s00253-018-9188-x // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2018. – № 17 (102). – P. 7309–7317.

244. Newman, D. J. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 / D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader. – DOI 10.1021/acs.jnatprod.5b01055 // Journal of Natural Products. – 2016. – № 3 (79). – P. 629–661.

245. Nguyen-Vo, T.-H. Plant Metabolite Databases: From Herbal Medicines to Modern Drug Discovery / T.-H. Nguyen-Vo, L. Nguyen, N. Do [et al.]. – DOI 10.1021/acs.jcim.9b00826 // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2020. – № 3 (60). – P. 1101–1110.

246. Nigon, V. M. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms / V. M. Nigon, M.-A. Félix. – DOI 10.1895/wormbook.1.181.1 // WormBook. – 2017. – P. 1–84.

247. Nile, S. H. Subcritical water extraction of with anosides and with anolides from Ashwagandha (Indian ginseng) and their biological activities / S. H. Nile, A. Nile, E. Gansukh [et al.]. – DOI 10.1016/j.fct.2019.110659 // Food and Chemical Toxicology. – 2019. – № 132. – P. 110659.

248. Noreng, S. Structure of the core human NADPH oxidase NOX2 / S. Noreng, N. Ota, Y. Sun [et al.]. – DOI 10.1038/s41467-022-33711-0 // Nature Communications. – 2022. – № 13. – P. 6079.

249. Oakley, A. J. Identification, characterization and structure of a new Delta class glutathione transferase isoenzyme / A. J. Oakley. – DOI 10.1042/BJ20042015 // Biochemical journal. – 2005. – № 3 (388). – P. 763–771.

250. Ohyama, K. Cytotoxicity and apoptotic inducibility of Vitex agnus-castus fruit extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth / K. Ohyama,



T. Akaike, C. Hirobe, T. Yamakawa // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2003. – № 1 (26). – P. 10–18.

251. Olivon, F. Bioactive Natural Products Prioritization Using Massive Multi-informational Molecular Networks / F. Olivon, P.-M. Allard, A. Koval [et al.]. – DOI 10.1021/acscchembio.7b00413 // *ACS Chemical Biology*. – 2017. – № 10 (12). – P. 2644–2651.

252. Omura, T. The carbon monoxide-binding pigment / T. Omura, R. Sato. – DOI 10.1016/S0021-9258(20)82245-5 // *Journal Biological Chemistry*. – 1964. – Vol. 7. – P. 2370–2378.

253. Pal, A. *In silico* and *in vitro* screening for potential anticancer candidates targeting GPR120 / A. Pal, J. F. Curtin, G. K. Kinsella – DOI 10.1016/j.bmcl.2020.127672 // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2021. – № 31. – P. 127672.

254. Pal, S. Inhibition of catalase by tea catechins in free and cellular state: a biophysical approach / S. Pal, S. K. Dey, C. Saha. – DOI 10.1371/journal.pone.0102460 // *PLoS One*. – 2014. – № 7 (9). – P. e102460.

255. Paoli, P. Enzymatic Inhibitors from Natural Sources: A Huge Collection of New Potential Drugs / P. Paoli. – DOI 10.3390/biom11020133 // *Biomolecules*. – 2021. – № 2 (11). – P. 133.

256. Parasuraman, S. Toxicological screening / S Parasuraman. – DOI 10.4103/0976-500X.81895 // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2011. – № 2 (2). – P. 74–79.

257. Patil, K. R. Pentacyclic Triterpenoids Inhibit IKK $\beta$  Mediated Activation of NF- $\kappa$ B Pathway: In Silico and In Vitro Evidences / K. R. Patil, P. Mohapatra, H. M. Patel [et al.]. – DOI 10.1371/journal.pone.0125709 // *PLoS One*. – 2015. – № 5 (10). – P. e0125709.

258. Pellegatti, M. Dogs and monkeys in preclinical drug development: the challenge of reducing and replacing / M. Pellegatti. – DOI 10.1517/17425255.2013.804061 // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. – 2013. – № 9 (9). – P. 1171–1180.

259. Peng, M. J. Simultaneous ligand fishing and identification of human serum albumin binders from *Eucommia ulmoides* bark using surface plasmon resonance-high

performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry / M. J. Peng, Y. P. Zhang, S. Y. Shi, S. Peng. – DOI 10.1016/j.jchromb.2013.09.032 // *Journal of Chromatography B*. – 2013. – № 940. – P. 86–93.

260. Perumal, V. *Advances in biosensors: principle, architecture and applications* / V. Perumal, U. Hashim. – DOI 10.1016/j.jab.2013.02.001 // *Journal of Applied Biomedicine*. – 2014. – № 12. – P. 1–15.

261. Picker, P. *Plant extracts in cell-based anti-inflammatory assays – pitfalls and considerations related to removal of activity masking bulk components* / P. Picker, S. Vogl, R. McKinnon [et al.]. – DOI 10.1016/j.phytol.2014.04.001 // *Phytochemistry Letters*. – 2014. – № 10. – P. xli–xlvii.

262. Pinzi, L. *Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery* / L. Pinzi, G. Rastelli. – DOI 10.3390/ijms20184331 // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – № 18 (20). – P. 4331.

263. Panossian, A. *Rosenoot (Rhodiola rosea): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy* / A. Panossian, G. Wikman, J. Sarris. – DOI 10.1016/j.phymed.2010.02.002 // *Phytomedicine*. – 2010. – V. 17, №7. – P. 481–493.

264. Poroikov, V. V. *20th euroqsar: understanding chemical-biological interactions* / V. V. Poroikov // *Molecular Informatics*. – 2015. – № 34 (6–7). – C. 340.

265. Poroikov, V. V. *Robustness of biological activity spectra predicting by computer program pass for noncongeneric sets of chemical compounds* / V. V. Poroikov, D. A. Filimonov, Yu.V. Borodina [et al.] // *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. – 2000. – № 6 (40). – P. 1349–1355.

266. Pouille, C. L. *Chicory: Understanding the Effects and Effectors of This Functional Food* / C. L. Pouille, S. Ouaza, E. Roels [et al.]. – DOI 10.3390/nu14050957 // *Nutrients*. – 2022. – № 5 (14). – P. 957.

267. Prashanth, J. R. *Pharmacological screening technologies for venom peptide discovery* / J. R. Prashanth, N. Hasaballah, I. Vetter. – DOI 10.1016/j.neuropharm.2017.03.038 // *Neuropharmacology*. – 2017. – V. 127. – P. 4–19.

268. Pu W.-L. Anti-inflammatory effects of *Rhodiola rosea* L.: A review / W.-L. Pu, M.-Y. Zhang, R.-Y. Bai [et al.]. – DOI 10.1016/j.biopha.2019.109552 // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2020. – № 121. – P. 109552.

269. Pyrkov, T. V. Molecular docking: role of intermolecular contacts in formation of complexes of proteins with nucleotides and peptides / T. V. Pyrkov, I. V. Ozerov, E. D. Blitskaia, R. G. Efremov. – DOI 10.1134/s1068162010040023 // *Bioorganicheskaiia Khimiiia*. – 2010. – № 4 (36). – P. 482–492.

270. Ramchandani, S. An overview of the potential antineoplastic effects of casticin / S. Ramchandani, I. Naz, J. H. Lee [et al.]. – DOI 10.3390/molecules25061287 // *Molecules*. – 2020. – T. 25, №. 6. – C. 1287.

271. Rameshrad, M. Rat aorta as a pharmacological tool for in vitro and in vivo studies / M. Rameshrad, H. Babaei, Y. Azarmi, D F Fouladi. – DOI 10.1016/j.lfs.2015.12.043 // *Life Sciences*. – 2016. – № 145. – P. 190–204.

272. Rask-Andersen, M. Trends in the exploitation of novel drug targets / M. Rask-Andersen, M. S. Almen, H. B. Schioth. – DOI 10.1038/nrd3478 // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2011. – V. 10. – P. 579–590.

273. Rasmussen, M. K. Regulation of cytochrome P450 mRNA expression in primary porcine hepatocytes by selected secondary plant metabolites from chicory (*Cichorium intybus* L.) / M. K. Rasmussen, C. L. Klausen, Bo. Ekstrand. – DOI 10.1016/j.foodchem.2013.09.068 // *Food Chemistry*. – 2014. – № 146. – P. 255–263.

274. Ribeiro, F. F. Docking of Natural Products against Neurodegenerative Diseases: General Concepts / F. F. Ribeir, F. J. B. Mendonca Jr., J. B. Ghasemi [et al.]. – DOI 10.2174/1386207321666180313130314 // *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. – 2018. – № 3 (21). – P. 152–160.

275. Robertson, A. L. A zebrafish compound screen reveals modulation of neutrophil reverse migration as an anti-inflammatory mechanism // A. L. Robertson, G. R. Holmes, A. N. Bojarczuk [et al.]. – DOI 10.1126/scitranslmed.3007672 // *Science Translational Medicine*. – 2014. – № 6 (225). – P. 225ra29.

276. Roemer, T. Confronting the challenges of natural product-based antifungal discovery / T. Roemer, D. M. Xu, S. B. Singh [et al.]. – DOI 10.1016/j.chembiol.2011.01.009 // Journal of Biological Chemistry. – 2011. – № 18. – P. 148–164.

277. Rollinger, J. M. *In silico* target fishing for rationalized ligand discovery exemplified on constituents of *Ruta graveolens* / J. M. Rollinger, D. Schuster, B. Danzl [et al.]. – DOI 10.1055/s-0028-1088397 // Planta Medica. – 2009. – Vol. 75. – P. 195–204.

278. Roy, A. *In silico* methods for design of biological therapeutics / A. Roy, S. Nair, N. Sen [et al.]. – DOI 10.1016/j.ymeth.2017.09.008 // Methods. – 2017. – № 131. – P. 33–65.

279. Ryu, C. S. Short-term regulation of the hepatic activities of cytochrome P450 and glutathione S-transferase by nose-only cigarette smoke exposure in mice / C. S. Ryu, Y. J. Choi, H. S. Nam [et al.]. – DOI 10.1016/j.fct.2018.12.035 // Food and Chemical Toxicology. – 2019. – № 125. – P. 182–189.

280. Saeidnia, S. From in vitro Experiments to in vivo and Clinical Studies; Pros and Cons / S. Saeidnia, A. Manayi, M. Abdollahi. – DOI 10.2174/1570163813666160114093140 // Current Drug Discovery Technologies. – 2015. – № 4 (12). – P. 218–224.

281. Saikia, S. Molecular Docking: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective / S. Saikia, M. Bordoloi. – DOI 10.2174/1389450119666181022153016 // Current Drug Targets. – 2019. – № 5 (20). – P. 501–521.

282. Sangiovanni, E. The effect of in vitro gastrointestinal digestion on the anti-inflammatory activity of *Vitis vinifera* L. leaves / E. Sangiovanni, C. Di Lorenzo, E. Colombo [et al.]. – DOI 10.1039/c5fo00410a // Food & Function journal. – 2015. – № 6 (8). – P. 2453–2463.

283. Sasiela, C. A. Identification of inhibitors for MDM2 ubiquitin ligase activity from natural product extracts by a novel high-throughput electrochemiluminescent screen / C. A. Sasiela, D. H. Stewart, J. Kitagaki [et al.]. – DOI 10.1177/1087057108315038 // Journal of Biomolecular Screening. – 2008. – № 13. – P. 229–237.

284. Schaffert, C. S. Role of MGST1 in reactive intermediate-induced injury / C. S. Schaffert. – DOI 10.3748/wjg.v17.i20.2552 // World Journal of Gastroenterology. – 2011. – Vol. 28, № 17 (20). – P. 2552–2557.

285. Schippmann, U. A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. / U. Schippmann, D. Leaman, A. B. Cunningham // Bogers, R. J. Medicinal and Aromatic Plants: Agricultural, Commercial, Ecological, Legal, Pharmacological and Social Aspects / R. J. Bogers, L. E. Craker, D. Lange (eds.). – Dordrecht : Springer, 2006. – P. 75–95.

286. Schmid, I. I. Natural products in high throughput screening: automated high-quality sample preparation / I. I. Schmid, I. I. Sattler, S. Grabley, R. Thiericke // Journal of Biomolecular Screening. – 1999. – № 4. – P. 15–25.

287. Schneider, E. Evaluation of polyphenol composition in red leaves from different varieties of *Vitis vinifera* / E. Schneider, von der H. Holger, A. Esperester. – DOI 10.1055/s-2008-1034370 // Planta Medica. – 2008. – № 5 (74). – P. 565–572.

288. Schuster, D. Identification of bioactive natural products by pharmacophore-based virtual screening / D. Schuster, G. Wolber. – DOI 10.2174/138161210791164072 // Current Pharmaceutical Design. – 2010. – № 15 (16). – P. 1666–1681.

289. Sevrioukova, I. Interaction of Human Drug-Metabolizing CYP3A4 with Small Inhibitory Molecules / I. Sevrioukova. – DOI 10.1021/acs.biochem.8b01221 // Biochemistry. – 2019. – № 7 (58). – P. 930–939.

290. Shen, C. Comprehensive assessment of nine docking programs on type II kinase inhibitors: prediction accuracy of sampling power, scoring power and screening power / C. Shen, Z. Wang, X. Yao [et al.]. – DOI 10.1093/bib/bby103 // Briefings in Bioinformatics. – 2018.

291. Shirasaka, Y. Inhibition of CYP2C19 and CYP3A4 by omeprazole metabolites and their contribution to drug-drug interactions / Y. Shirasaka, J. E. Sager, J. D. Lutz [et al.] // Drug Metabolism and Disposition. – 2013. – № 7 (41). – P. 1414–1424.

292. Shori, A. B. Screening of antidiabetic and antioxidant activities of medicinal plants / A. B. Shori. – DOI 10.1016/S2095-4964(15)60193-5 // Journal of Integrative Medicine. – 2015. – № 5 (13). – P. 297–305.

293. Skała, E. Caffeoylquinic Acids with Potential Biological Activity from Plant In vitro Cultures as Alternative Sources of Valuable Natural Products / E. Skała, J. Makowczyńska, J. Wieczfinska [et al.]. – DOI 10.2174/1381612826666200212115826 // Current Pharmaceutical Design. – 2020. – № 24 (26). – P. 2817–2842.

294. Srinivasan, K. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening / K. Srinivasan, B. Viswanad, L. Asrat. – DOI 10.1016/j.phrs.2005.05.004 // Pharmacological Research. – 2005. – № 4 (52). – P. 313–320.

295. Staniek, A. Natural products – learning chemistry from plants / A. Staniek, H. Bouwmeester, P. D. Fraser [et al.] // Biotechnology Journal. – 2014. – № 9. – P. 326–336.

296. Steindl, T. M. Parallel screening and activity profiling with HIV protease inhibitor pharmacophore models / T. M. Steindl, D. Schuster, C. Laggner [et al.]. – DOI 10.1021/ci600321m // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2007. – V. 47. – P. 563–571.

297. Street, R. A. Cichorium intybus: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. / R. A. Street, J. Sidana, G. Prinsloo. – DOI 10.1155/2013/579319 // Evid. Based Complement. Alternat. Med. – 2013. – P. 579319.

298. Sun, M. Screening nephroprotective compounds from cortex Moutan by mesangial cell extraction and UPLC / M. Sun, L. M. Huang, J. L. Zhu [et al.]. – DOI 10.1007/s12272-014-0469-3 // Archives of Pharmacal Research. – 2015. – № 38. – P. 1044–1053.

299. Swindle, M. M. Swine as models in biomedical research and toxicology testing / M. M. Swindle, A. Makin, A. J. Herron [et al.]. – DOI 10.1177/0300985811402846 // Veterinary Pathology. – 2012. – № 2 (49). – P. 344–356.

300. Tashiro, E. Chemical biology of compounds obtained from screening using disease models / E. Tashiro, M. Imoto. – DOI 10.1007/s12272-015-0633-4 // Archives of Pharmacal Research. – 2015. – № 9 (38). – P. 1651–1560.

301. Telpoukhovskaia, M. A. *In silico* to *in vitro* screening of hydroxypyridinones as acetylcholinesterase inhibitors / M. A. Telpoukhovskaia, B. O. Patrick, C. Rodríguez-

Rodríguez, C. Orvig. – DOI 10.1016/j.bmcl.2016.01.080 // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2016. – № 6 (26). – P. 1624–1628.

302. Thevenot, R. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification / R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson. – DOI 10.1016/s0956-5663(01)00115-4 // *Pure and Applied Chemistry*. – 1999. – № 71. – P. 2333–2348.

303. Thomsen, R. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking / R. Thomsen, M. H. Christensen. – DOI 10.1021/jm051197e // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2006. – № 11 (49). – P. 3315–3321.

304.

305. Tighe, S. P. Chronic Liver Disease and Silymarin: A Biochemical and Clinical Review / S. P. Tighe, D. Akhtar, U. Iqbal, A. Ahmed. – DOI 10.14218/JCTH.2020.00012 // *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. – 2020. – № 4 (8). – P. 454–458.

306. Tsai, K. L. Chicoric acid is a potent anti-atherosclerotic ingredient by antioxidant action and anti-inflammation capacity / K. L. Tsai, C. L. Kao, C. H. Hung [et al.]. – DOI 10.18632/oncotarget.16768 // *Oncotarget*. – 2017. – № 8 (18). – P. 29600–29612.

307. Tu, Y. Automated high-throughput system to fractionate plant natural products for drug discovery / Y. Tu, C. Jeffries, H. Ruan, C. Nelson [et al.]. – DOI 10.1021/np9007359 // *Journal of Natural Products*. – 2010. – № 73. – P. 751–754.

308. Ud-Din, S. Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin / S. Ud-Din, A. Bayat. – DOI 10.1111/wrr.12513 // *Wound Repair and Regeneration*. – 2017. – № 2 (25). – P. 164–176.

309. Van der Laan, J. W. Regulatory acceptability of the minipig in the development of pharmaceuticals, chemicals and other products / J. W. van der Laan, J. Brightwell, P. McAnulty [et al.]. – DOI 10.1016/j.vascn.2010.05.005 // *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. – 2010. – № 3 (62). – P. 184–195.

310. Venancio-Brochi, J. C. Glutathione reductase: A cytoplasmic antioxidant enzyme and a potential target for phenothiazinium dyes in *Neospora caninum* / J. C. Venancio-



Brochi, L. M. Pereira, F. A. Calil [et al.]. – DOI 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.108 // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – № 187. – P. 964–975.

311. Vogel, H. G. Drug Discovery and Evaluation. Safety and Pharmacokinetic Assays / H. G. Vogel. – Germany, 2002. – 29 p.

312. Vu, H. Direct screening of natural product extracts using mass spectrometry / H. Vu, N. B. Pham, R. J. Quimn. – DOI 10.1177/1087057108315739 // Journal of biomolecular screening. – 2008. – V. 13. – P. 265–275.

313. Wang, C. Y. Screening and quantification of anticancer compounds in traditional chinese medicine by hollow fiber cell fishing and hollow fiber liquid/solid-phase microextraction / C. Y. Wang, S. Hu, X. Chen, X. H. Bai. – DOI 10.1002/jssc.201600103 // Journal of Separation Science. – 2016. – № 39. – P. 1814–1824.

314. Wang, J. J. Phytoecdysteroids from *Ajugaiva* act as potential antidiabetic agent against alloxan-induced diabetic male albino rats / J. J. Wang, H. Jin, S. L. Zheng [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy – 2017. – № 96. – P. 480–488.

315. Whaley, A. K. Phytochemical Analysis of Polyphenol Secondary Metabolites in Cloudberry (*Rubus Chamaemorus* L.) Leaves / A. K. Whaley, A. O. Ponkratova, A. A. Orlova [et al.]. – DOI 10.1007/s11094-021-02407-y // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2021. – № 55. – P. 253–258.

316. Wood, A. J. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs / A. J. Wood, T. W. Lo, B. Zeitler [et al.]. – DOI 10.1126/science.1207773 // Science. – 2011. – № 333 (6040). – P. 307.

317. Wooll, J. O. Structural and Functional Linkages Between Subunit Interfaces in Mammalian Pyruvate Kinase / J. O. Wooll, R. H. E. Friesen, M. A. White [et al.]. – DOI 10.1006/jmbi.2001.4978 // Journal of molecular biology. – 2001. – № 3 (312). – P. 525–540.

318. Wright, J. D. The role of S-mephenytoin hydroxylase (CYP2C19) in the metabolism of the antimalarial biguanides / J. D. Wright, N. A. Helsby, S. A. Ward. – DOI 10.1111/j.1365-2125.1995.tb04474.x // British Journal of Clinical Pharmacology – 1995. – № 4 (39). – P. 441–444.



319. Wu, D. Study on major antitumor components in Yinchenhao decoction *in vitro* and *in vivo* based on hollow fiber cell fishing coupled with high performance liquid chromatography / D. Wu, X. Chen, S. Hu, X. H. Bai. – DOI 10.1016/j.jchromb.2017.06.003 // Journal of Chromatography B. – 2017. – № 1060. – P. 118–125.
320. Wu, X. Quality Markers Based on Biological Activity: A New Strategy for the Quality Control of Traditional Chinese Medicine / X. Wu, H. Zhang, S. Fan [et al.]. – DOI 10.1016/j.phymed.2018.01.016 // Phytomedicine. – 2018. – V. 15 (44). – P. 103–108.
321. Wuttke, W. Chaste tree (*Vitex agnus-castus*)–pharmacology and clinical indications / W. Wuttke, H. Jarry, V. Christoffel [et al.]. – DOI 10.1078/094471103322004866 // Phytomedicine. – 2003. – № 4 (10). – P. 348–357.
322. Xu, W. State of *Panax ginseng* Research: A Global Analysis / W. Xu, H.-K. Choi, L. Huang. – DOI 10.3390/molecules22091518 // Molecules. – 2017. – № 9 (22). – P. 1518.
323. Xue, X. Hollow fiber cell fishing with highperformance liquid chromatography for screening bioactive compounds from traditional Chinese medicines / X. Xue, L. H. Li, X. Chen [et al.]. – DOI 10.1016/j.chroma.2013.01.033 // Journal of Chromatography A. – 2013. – № 1280. – P. 75–83.
324. Yahfoufi, N. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols / N. Yahfoufi, N. Alsadi, M. Jambi, C. Matar. – DOI 10.3390/nu10111618 // Nutrients. – 2018. – № 10 (11). – P. 1618.
325. Yan, Y. Y. Hollow fiber cell fishing with highperformance liquid chromatography for screening bioactive anthraquinones from traditional Chinese medicines / Y. Y. Yan, Y. M. Hao, S. Hu [et al.]. – DOI 10.1016/j.jpba.2014.06.030 // Journal of Chromatography A. – 2013. – № 1322. – P. 8–17.
326. Yang, W. Integrated Strategy From In Vitro, In Situ, In Vivo to In Silico for Predicting Active Constituents and Exploring Molecular Mechanisms of Tongfengding Capsule for Treating Gout by Inhibiting Inflammatory Responses / W. Yang, X. Jiang, J. Liu [et al.]. – DOI 10.3389/fphar.2021.759157 // Frontiers in Pharmacology. – 2021. – №12. – P. 759157.

327. Yano, J. K. The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 Determined by X-ray Crystallography to 2.05-Å Resolution / J. K. Yano, M. R. Wester, G. A. Schoch [et al.]. – DOI 10.1074/jbc.C400293200 // Journal of molecular biology. – 2004. – № 37 (279). – P. 38091–38094.

328. Yao, L. *In silico* search for drug targets of natural compounds / L. Yao. – DOI 10.2174/138920112800958940 // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2012. – № 9 (13). – P. 1632–1639.

329. Yu, J. Crystal structure of glutathione reductase Glr1 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / J. Yu, C. Z. Zhou. – DOI 10.1002/prot.21354 // Proteins. – 2007 Sep 1. – P. 972–979.

330. Yu, L. Target molecular-based neuroactivity screening and analysis of panax ginseng by affinity ultrafiltration, uplc-qtof-ms and molecular docking / L. Yu, F. Wei, J. Liang [et al.]. – DOI 10.1142/S0192415X19500691 // The American journal of Chinese medicine. – 2019. – № 47. – P. 1345–1363.

331. Yuan, J. B. Component analysis and target cell-based neuroactivity screening of Panax ginseng by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight mass spectrometry / J. B. Yuan, Y. Chen, J. Liang [et al.]. – DOI 10.1016/j.jchromb.2016.10.014 // Journal of Chromatography B. – 2016. – Vol. 1038. – P. 1–11.

332. Zambrowicz, B. P. Knockouts model the 100 best-selling drugs-will they model the next 100? / B. P. Zambrowicz, A. T. Sands. – DOI 10.1038/nrd987 // Nature Reviews Drug Discovery. – 2003. – № 1 (2). – P. 38–51

333. Zhang, G.-J. Optical imaging of tumor cells in hollow fibers: evaluation of the antitumor activities of anticancer drugs and target validation / G.-J. Zhang, T.-B. Chen, B. Bednar [et al.]. – DOI 10.1593/neo.07421 // Neoplasia. – 2007. – № 8 (9). – P. 652–661.

334. Zhang, L. S. Rapid screening of different types of antitumor compound groups from traditional Chinese medicine by hollow fiber cell fishing with high performance liquid chromatography / L. S. Zhang, X. Chen, S. Hu [et al.]. – DOI 10.2174/

1386207317666141031101709 // Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. – 2014. – № 17. – P. 827–836.

335. Zhang, X. Emerging strategies for the activity assay and inhibitor screening of alpha-glucosidase / X. Zhang, G. Li, D. Wu [et al.]. – DOI 10.1039/c9fo01590f // Journal of Functional Foods. – 2020. – № 1 (11). – P. 66–82.

336. Zhang, Y. P. On-line surface plasmonresonance-high performance liquid chromatography-tandem massspectrometry for analysis of human serum albumin binders from Radixastragali / Y. P. Zhang, S. Y. Shi, J. F. Guo [et al.]. – DOI 10.1016/j.chroma.2013.04.015 // Journal of Chromatography A. – 2013. – № 1293. – P. 92–99.

337. Zheng, C. J. Phytochemical and Pharmacological Profile of Vitex negundo / C. J. Zheng, H. Q. Li, S. C. Ren [et al.]. – DOI 10.1002/ptr.5303 // Phytotherapy Research. – 2015. – № 5 (29). – P. 633–647.

338. Zheng, F. A highly efficient cocaine-detoxifying enzyme obtained by computational design / F. Zheng, L. Xue, S. Hou [et al.]. – DOI 10.1038/ncomms4457 // Nature Communications. – 2014. – V. 5. – P. 3457.

339. Zhou, S. F. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4 / S. F. Zhou // Current Drug Metabolism. – 2008. – № 4 (9). – P. 310–322.

340. Zhu, J. Polyphenols can inhibit furin in vitro as a result of the reactivity of their auto-oxidation products to proteins / J. Zhu, W. J. Van de Ven, T. Verbiest // Current Medicinal Chemistry. – 2013. – № 20. – P. 840–850.

341. Zhuo R. J. Ligand fishing: a remarkable strategy for discovering bioactive compounds from Complex mixture of natural products / R. J. Zhuo, H. Liu, N. N. Liu, Y. Wang. – DOI 10.3390/molecules21111516 // Molecules. – 2016. – № 21. – P. 1516–1531.

342. Zicha, J. Nitric oxide and salt resistance in Dahl rats: no role of inducible NO synthase / J. Zicha, L. Řezáčová, I. Vaněčková. – DOI 10.33549/physiolres.935047 // Physiological Research. – 2023. – Vol. 72 (1). – P. 123–127.

343. Zou, L. Effects of intrinsic fluorescence and quenching on fluorescence-based screening of natural products / L. Zou, M. R. Harkey, G. L. Henderson. – DOI 10.1078/0944-7113-00121 // Phytomedicine. – 2002. – № 9. – P. 263–267.

**Приложение А.**  
**Положение о Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro***

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»  
(ФГБНУ ВИЛАР)

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ФГБНУ ВИЛАР,  
академик РАН

  
18.05.2024 г.



ПОЛОЖЕНИЕ О БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ  
СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*

## Введение

В ФГБНУ ВИЛАР ведется разработка приоритетного направления создания специфических ферментных биотест-систем *in vitro*, проявляющих высокую избирательность к биологически активным веществам (БАВ), обладающим соответствующими фармакологическими свойствами. Разработаны и запатентованы оригинальные биотест-системы на основе ферментов антиоксидантной защиты (глутатионредуктазы и каталазы), НАДФН-оксидазы, ферментов биотрансформации-система цитохрома P<sub>450</sub> и глутатионтрансферазы и др. для выявления специфической биологической активности БАВ различного происхождения и агрегатного состояния, в том числе при их скрининге при проведении доклинических исследований.

Оригинальные молекулярные специфические ферментные биотест-системы ФГБНУ ВИЛАР (СФБТС) обладают высокой избирательностью, информативностью, чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, быстротой достижения результатов, позволяют оптимизировать доклинические исследования.

Данные, полученные с помощью СФБТС *in vitro*, применяются при фармакологических и фармацевтических исследованиях, в том числе – для направленного скрининга БАВ, изучения молекулярного механизма действия, экспресс-оценки качества растительного сырья и биотехнологических продуктов, оптимизации экстрагирования БАВ из растительного сырья, для поиска маркеров стандартизации объектов растительного происхождения, для оценки их безопасности.

Для оценки целевой биологической активности изучаемого образца, который может быть, как индивидуальным веществом, так и объектом сложного состава, применяют определенную СФБТС, которая позволяет охарактеризовать определенный вид биологической активности. Каждая СФБТС позволяет оценить соединения по одному биологическому параметру, поэтому для выявления активности в отношении патологий с многофакторным механизмом действия необходимо сочетать соответствующие первичные биотест-системы с формированием на их основе вторичных СФБТС.

В состав Биологической коллекции входит 10 специфических ферментных биотест-систем: 4 первичных и 6 вторичных (Приложение 1).

### **I. Общие положения**

1.1. Биологическая коллекция специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС) ФГБНУ ВИЛАР, началом формирования которой является 1997 год, организационно оформлена в соответствии с Приказами по ВИЛАР № 59а от 17.07.2013 г. и № 79 от 15.06. 2015 г.

1.2. БК-СФБТС функционирует на основании приказов директора ФГБНУ ВИЛАР, нормативных документов, регламентирующих работу с биоресурсами, в соответствии с профилем деятельности, а также Устава ФГБНУ ВИЛАР и настоящего Положения.

1.3. Административное, материально-техническое обеспечение и финансирование деятельности БК-СФБТС осуществляет ФГБНУ ВИЛАР.

### **II. Основные понятия, термины и определения**

**Биотест-система (БТС)** - это интегрированное сочетание биодатчика (биообъекта) молекулярного, клеточного, тканевого и организменного уровней со считывающим, обрабатывающим и регистрирующим устройством. В качестве биообъекта наибольшее распространение на данный момент получили биомакромолекулы - ферменты, антитела, рецепторные белки, нуклеиновые кислоты, а также целые клетки.

**Ферменты или энзимы** - обычно белковые молекулы, ускоряющие (катализирующие) химические реакции в живых системах. Ферменты специфичны к субстратам. Ферментативная активность регулируется активаторами и ингибиторами реакции.

**Ингибитор** - вещество, присутствующее в небольших количествах в среде, приводит к предотвращению или замедлению некоторых процессов. Снижает скорость химических реакций или подавляет их.

**Активатор** - вещество, присутствующее в небольших количествах в среде, приводит к ускорению некоторых процессов. Увеличивает скорость химических реакций.



**Субстрат (реакции)** - исходный продукт (вещество) преобразуемый ферментом в результате специфического фермент-субстратного взаимодействия в конечный продукт.

### **III. Цель и основные задачи функционирования БК-СФБТС**

3.1. Целью работы с БК-СФБТС является сохранение перспективных специфических ферментных биотест-систем *in vitro* для проведения на молекулярном уровне фундаментальных медико-биологических исследований.

3.2. Задачами БК-СФБТС является:

- хранение и отбор биотест-систем *in vitro*, участвующих при проведении доклинических испытаний лекарственных препаратов, разработанных в ФГБНУ ВИЛАР.

- сохранение специфических ферментных биотест-систем, имеющих утвержденную и зарегистрированную в ФГБНУ ВИЛАР стандартную операционную процедуру и входящие в Реестр СФБТС (Приложение 1).

### **IV. Компоненты коллекции и перечень работ, осуществляемых с объектами БК-СФБТС**

4.1. Компонентами БК-СФБТС являются - биотест-системы, разработанные на основе одного тест-фермента (первичные) и комплексные специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, разработанные на основе 2-х и более тест-ферментов (вторичные).

4.2. С использованием БК-СФБТС выполняются работы по формированию, сохранению и обеспечению доступности для подразделений ФГБНУ ВИЛАР коллекционного фонда специфических ферментных биотест-систем *in vitro*, разработанных для оценки фармакологических свойств БАВ, а также качества и безопасности лекарственных средств.

4.3. БК-СФБТС используется в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, полученными государственными грантами, хозяйственными договорами, указаниями и распоряжениями дирекции ФГБНУ ВИЛАР и настоящим положением.

4.4. БК-СФБТС способствует разработке новых специфических ферментных ферментных биотест-систем, основанных на ключевых ферментах гомеостаза организма человека для выявления биологической активности БАВ различного происхождения.

4.5. Выполнение исследований по выявлению специфической биологической активности БАВ, полученных из лекарственных растений, проводятся в ФГБНУ ВИЛАР в соответствии с СОП, разработанными для каждой специфической ферментной биотест-системы, утвержденными и сохраняемыми в коллекции.

4.6. БК-СФБТС способствует повышению уровня биотехнологических разработок, применяемых в институте; используется при проведении фундаментальных и прикладных исследований сотрудникам ФГБНУ ВИЛАР, студентами, аспирантами и другими специалистами при изучении биологической активности БАВ в пищевых, медицинских, ветеринарных и других целях.

#### **V. Руководство работой с БК**

5.1. Руководство работой с БК-СФБТС осуществляет заведующий соответствующего научного подразделения ФГБНУ ВИЛАР (при необходимости назначается куратор БК-СФБТС).

5.2. Руководитель (куратор) БК-СФБТС имеет право:

- подготавливать и представлять в установленном порядке материалы, связанные с выполняемой научно-исследовательской деятельностью БК-СФБТС;
- представлять БК-СФБТС на совещаниях, семинарах, симпозиумах, конференциях;
- представлять ФГБНУ ВИЛАР в вышестоящей и других организациях по вопросам, связанным с профилем БК-СФБТС;
- взаимодействовать с профильными национальными биоресурсными центрами (БРЦ) в вопросах методологии поддержания и идентификации коллекционного фонда, определения уровней риска, сохранения ценных биоресурсов.

5.3. Руководитель (куратор) БК-СФБТС обязан:

- соблюдать нормы действующего законодательства;



- выполнять задания, формулируемые дирекцией ФГБНУ ВИЛАР;
- обеспечивать научную организацию работы;
- осуществлять правильный подбор, расстановку кадров и соблюдение дисциплины.

## VI. Требования к БК-СФБТС

6.1. БК-СФБТС используется:

- при выполнении научно-исследовательских и прикладных работ, проводимых ФГБНУ ВИЛАР;
- при формировании открытых баз данных о поддерживаемом коллекционном фонде (при согласовании с директором ФГБНУ ВИЛАР);

6.2. В БК-СФБТС должны быть обеспечены:

- воспроизводимость специфических фармакологических свойств БАВ с применением специфических ферментных биотест-систем *in vitro*;
- учет коллекционного фонда с указанием источника их приобретения/выделения, сведений, характеризующих степень опасности использования коллекционных объектов в исследовательских или прикладных целях для человека и окружающей среды;
- требования нормативных документов, связанных с оборотом биоресурсов, относящихся к профилю его деятельности.

## VII. Регистрация и информационное обеспечение объектов БК-СФБТС

7.1. Все объекты БК-СФБТС должны быть зарегистрированы в установленном порядке и содержать необходимый минимум информации.

7.2. Все объекты должны входить в утвержденный Реестр.

7.3. Порядок работы с использованием объектов БК-СФБТС отражен в разработанных нормативных документах:

- 1) Метод расширения БК-СФБТС, М-04868244-111-2024;
- 2) Метод характеристики единиц хранения БК-СФБТС, М-04868244-110-2024;
- 3) СОП 02.01.054.2024 «Коррекция нарушений качества единиц хранения БК-СФБТС»;
- 4) СОП 02.01.055.2024 «Поддержание единиц хранения БК-СФБТС»;

5) СОП 02.01.055.2024 «Контроль качества единиц хранения БК-СФБТС».

### VIII. Правовой статус БК-СФБТС

8.1. БК-СФБТС ФГБНУ ВИЛАР принадлежит Российской Федерации, является собственностью государства и общенародным достоянием.

8.2. Любая деятельность с БК-СФБТС должна гарантировать ее сохранность.

8.3. Деятельность с БК-СФБТС не должна наносить ущерба окружающей среде.

8.4. При регулировании отношений в области использования БК-СФБТС общепризнанные нормы международного права и международные соглашения применяются в соответствии с законодательством Российской Федерации.

8.5. В случае угрозы сохранения объектов БК-СФБТС, при наличии решения директора ФГБНУ ВИЛАР предложить такие объекты для открытого распространения - коллекционные объекты могут передаваться в профильный БРЦ (по согласованию между ФГБНУ ВИЛАР и профильным БРЦ).

Положение разработано:

Руководитель Центра доклинических  
исследований, канд. биол. наук  
Заведующий отделом  
экспериментальной фармакологии, д-р  
мед. наук

  
Лупанова И.А.

  
Ферубко Е.В.

Положение согласовано:

И.о. заместителя директора,  
канд. фарм. наук

  
Сёмкина О.А.

**Приложение Б.**  
**Реестр Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro***

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»  
(ФГБНУ ВИЛАР)

УТВЕРЖДАЮ  
Директор ФГБНУ ВИЛАР,  
академик РАН

  
15 июля 2024 г.



**РЕЕСТР**  
**БИОКОЛЛЕКЦИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ**  
***IN VITRO***

Москва 2024

РЕЕСТР  
БИОКОЛЛЕКЦИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ  
БИОТЕСТ-СИСТЕМ *IN VITRO*

| №  | Название биотест-системы <i>in vitro</i>   | Выявляемые свойства БАВ      | Нормативные документы   |
|----|--|------------------------------|---|
| 1. | Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы | Адаптогенные свойства БАВ    | <p>1. Патент №2181890. «Способ выявления веществ, обладающих адаптогенными свойствами, <i>in vitro</i>». Быков В.А., Минеева М.Ф., Дубинская В.А., Ребров Л.Б., Колхир В.К.</p> <p>2. СОП 01.01.049.2024 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы <i>in vitro</i>», 11 стр.</p>       |
| 2. | Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы | Антиоксидантные свойства БАВ | <p>1. Патент РФ № 2181892. «Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, <i>in vitro</i>» Быков В.А.; Дубинская В.А.; Минеева М.Ф.; Ребров Л.Б.; Колхир В.К.</p> <p>2. СОП 01.01.049.2024 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы <i>in vitro</i>», 11 стр.</p> |
| 3. | Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе каталазы и глутатионредуктазы | Антимикробные свойства БАВ   | <p>1. Патент № 2181891. «Способ выявления веществ, обладающих противомикробными и противовирусными свойствами, <i>in vitro</i>» Быков В.А., Дубинская В.А., Минеева М.Ф., Ребров Л.Б., Колхир В.К.</p>  |



|    |   |   |   |
|----|---|---|---|
|    |   |   | 2. СОП 01.01.049.2024 «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы in vitro», 11 стр.   |
| 4. | Первичная НАДФН-оксидазная ферментная биотест-система in vitro      | Иммуномодулирующие свойства БАВ               | 1. Патент №2194077. «Способ выявления веществ с потенциальной иммуномодулирующей активностью in vitro с применением НАДФН - оксидазной тест-системы» Быков В.А., Минеева М.Ф., Попова Н.Б.<br>2. СОП 02.01.050.2024 «Определение иммуномодулирующих свойств растительных биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе НАДФН-оксидазы», 6 стр. |
| 5. | Первичная тирозингидроксилазная ферментная биотест-система in vitro | Дофаминергические (нейротропные) свойства БАВ | 1. СОП 02.01.052.2024 «Определение скорости тирозингидроксилазной реакции методом прямого спектрофотометрического измерения»), используемые в экспериментальных исследованиях», 5 стр.  |
| 6. | Первичная пируваткиназная ферментная биотест-система in vitro       | Энергизирующие свойства БАВ                   | 1. Методика: «Выявление активаторов субстратного фосфорилирования в объектах растительного происхождения путем определения скорости пируваткиназной реакции на биохимическом анализаторе «Clima M-15» для исследований по направленному поиску и созданию вентонизирующих средств». М. ГНУ ВИЛАР, 2010 - 5стр.  |

|     |   |   |   |
|-----|---|---|---|
| 7.  | Вторичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе глутатионредуктазы и пируваткиназы | Венотонизирующие свойства БАВ               | 1. СОП 43 от 15.09.2023 «Определение венотонизирующих свойств биологически активных веществ с применением комплекса специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> », 6 стр.   |
| 8.  | Вторичная биотест-система на основе цитохрома P450 и глутатионтрансферазы                         | Выявление БАВ с антиоксидантными свойствами | 1. Патент РФ №2316597 «Способ выявления антиоксидантных свойств биологически активных веществ» Быков В.А., Минеева М.Ф., Стрелкова Л.Б., Колхир В.К., Ребров Л.Б.<br>2. СОП 02.01.051.2024 «Определение антиоксидантных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе цитохрома P450 и глутатионтрансферазы <i>in vitro</i> », 6 стр.     |
| 9.  | Первичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе индуцибельной NO-синтазы (iNOS)    | Противовоспалительные свойства БАВ          | 1. Методика: «Выявление противовоспалительных свойств БАВ с помощью ферментной биотест-системы <i>in vitro</i> на основе индуцибельной NO-синтазы» № М04868244-37-2014. М. ФБГНУ ВИЛАР, 2014 г., 19 стр.<br>2. СОП 02.01.053.2024 «Определение противовоспалительных свойств биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе индуцибельной NO-синтазы <i>in vitro</i> », 10 стр. |
| 10. | Первичная ферментная биотест-система <i>in vitro</i> на основе тиреопероксидазы                   | Тиреотропные свойства БАВ                   | 1. СОП 02.01.048.2024, «Определение тиреотропных свойств биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на  |

|  |  |  |  |
|--|--|--|--|
|  |  |  | основе тиреопероксидазы (ТПО) in vitro», 10 стр. |
|--|--|--|--|

Ответственный за поддержание и сохранение  
БК-СФБТС, руководитель Центра  
доклинических исследований



И.А. Лупанова

**Приложение В.**  
**Метод расширения Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro***

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
 ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»  
 (ФГБНУ ВИЛАР)

|  |                     |
|--|---------------------|
| Метод расширения коллекции   | M-04868244-111-2024 |
| Метод расширения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> | Стр. 1/3            |



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВИЛАР,  
 академик РАН

Н.И. Сидельников

2024 г.

МЕТОД РАСШИРЕНИЯ  
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ  
 СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*

|              |   |               |  |            |
|--------------|---|---------------|--|------------|
| Согласовано: | И.о.зам. директора,<br>канд. фарм. наук                                     | Сёмкина О.А.  |  | 26.04.2024 |
| Разработано: | Руководитель<br>Центра<br>доклинических<br>исследований,<br>канд.биол.наук  | Лупанова И.А. |  | 23.04.2024 |
|              | Заведующий<br>отделом<br>экспериментальной<br>фармакологии, д-р<br>мед.наук | Ферубко Е.В.  |  | 23.04.2024 |

Москва – 2024 г.



**Приложение Г.**  
**Метод характеристики единиц хранения Биологической коллекции**  
**специфических ферментных биотест-систем *in vitro***

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ (ФАНО РОССИИ)  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И  
 АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ» ФГБНУ ВИЛАР

|  |                     |
|--|---------------------|
| Метод характеристики единиц хранения   | M-04868244-110-2024 |
| Метод характеристики единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> | Стр. 1/8            |



УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВИЛАР,  
 академик РАН

*[Signature]* Н.И. Сидельников  
 «26» апреля 2024 г.

МЕТОД ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ЕДИНИЦ ХРАНЕНИЯ  
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ  
 СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*

|              |  |               |                    |            |
|--------------|--|---------------|--------------------|------------|
| Согласовано: | И.о.зам. директора,<br>канд. фарм. наук                                      | Сёмкина О.А.  | <i>[Signature]</i> | 26.04.2024 |
| Разработано: | Руководитель<br>Центра<br>доклинических<br>исследований,<br>канд. биол. наук | Лупанова И.А. | <i>[Signature]</i> | 23.04.2024 |
|              | Заведующий<br>отделом<br>экспериментальной<br>фармакологии, д-р<br>мед. наук | Ферубко Е.В.  | <i>[Signature]</i> | 23.04.2024 |

Москва – 2024 г.

**Приложение Д.**  
**СОП «Коррекция нарушений качества единиц хранения Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro*»**

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
 ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»  
 (ФГБНУ ВИЛАР)

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| СОП для коррекции нарушений  | СОП – 02.01.054.2024,<br>версия 1 |
| СОП для коррекции нарушений качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> | Стр. 1/10                         |

УТВЕРЖДАЮ  
 Директор ФГБНУ ВИЛАР,  
 академик РАН

Н.И. Сидельников  
 2024 г.

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ КАЧЕСТВА ЕДИНИЦ ХРАНЕНИЯ  
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ  
 СПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*



Стандартная операционная процедура  
 СОП - 02.01.054.2024,  
 Версия 1

|              |   |               |  |            |
|--------------|---|---------------|--|------------|
| Согласовано: | И.о.зам. директора,<br>канд. фарм. наук                                     | Сёмкина О.А.  |  | 17.04.2024 |
| Разработано: | Руководитель<br>Центра<br>доклинических<br>исследований,<br>канд.биол.наук  | Лупанова И.А. |  | 15.04.2024 |
|              | Заведующий<br>отделом<br>экспериментальной<br>фармакологии, д-р<br>мед.наук | Ферубко Е.В.  |  | 15.04.2024 |

Москва – 2024 г.

**Приложение Е.**  
**СОП «Поддержание единиц хранения Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro*»**

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
 ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»  
 (ФГБНУ ВИЛАР)

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| СОП для поддержания единиц хранения   | СОП - 02.01.056.2024,<br>версия 1 |
| СОП для поддержания единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> | Стр. 1/14                         |

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВИЛАР,  
академик РАН

*Сидельников*

Н.И. Сидельников

«17» апреля

2024 г.



ПОДДЕРЖАНИЕ ЕДИНИЦ ХРАНЕНИЯ  
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ  
 СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*

Стандартная операционная процедура  
 СОП – 02.01.056.2024

|              |   |               |                 |            |
|--------------|---|---------------|-----------------|------------|
| Согласовано: | И.о.зам. директора,<br>канд. фарм. наук                                     | Сёмкина О.А.  | <i>Сёмкина</i>  | 17.04.2024 |
| Разработано: | Руководитель<br>Центра<br>доклинических<br>исследований,<br>канд.биол.наук  | Лупанова И.А. | <i>Лупанова</i> | 15.04.2024 |
|              | Заведующий<br>отделом<br>экспериментальной<br>фармакологии, д-р<br>мед.наук | Ферубко Е.В.  | <i>Ферубко</i>  | 15.04.2024 |

Москва 2024

**Приложение Ж.**  
**СОП «Контроль качества единиц хранения Биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro*»**

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
 ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
 «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
 ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»  
 (ФГБНУ ВИЛАР)

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| СОП контроля качества   | СОП – 02.01.055.2024,<br>версия 1 |
| СОП контроля качества единиц хранения биологической коллекции специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i> | Стр. 1/5                          |

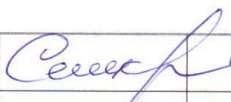

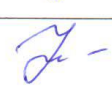
УТВЕРЖДАЮ  
 Директор ФГБНУ ВИЛАР,  
 академик РАН

  
 Н.И. Сидельников  
 «17» апреля 2024 г.



КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЕДИНИЦ ХРАНЕНИЯ  
 БИОЛОГИЧЕСКОЙ КОЛЛЕКЦИИ  
 СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТ-СИСТЕМ *in vitro*

**Стандартная операционная процедура**  
**СОП - 02.01.055.2024**




|              |   |               |  |            |
|--------------|---|---------------|--|------------|
| Согласовано: | И.о.зам. директора,<br>канд. фарм. наук                                     | Сёмкина О.А.  |  | 17.04.2024 |
| Разработано: | Руководитель<br>Центра<br>доклинических<br>исследований,<br>канд.биол.наук  | Лупанова И.А. |  | 15.04.2024 |
|              | Заведующий<br>отделом<br>экспериментальной<br>фармакологии, д-р<br>мед.наук | Ферубко Е.В.  |  | 15.04.2024 |

Москва – 2024 г.



**Приложение И.**  
**СОП «Определение антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы и глутатионредуктазы *in vitro*»**

| Отдел экспериментальной фармакологии ФГБНУ ВИЛАР |                 |                              |                              |              |
|--|-----------------|------------------------------|------------------------------|--------------|
| СОП №:<br>02.01.039.2022                         | Номер версии: 1 | Начало действия:<br>11.01.22 | Действителен до:<br>11.01.24 | стр. 1 из 11 |

| Стандартная операционная процедура  |  |         |   |                 |
|---|--|---------|---|-----------------|
| <b>ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ, АДАПТОГЕННЫХ И АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВ РАСТИТЕЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМБИНИРОВАННОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФЕРМЕНТНОЙ БИОТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ КАТАЛАЗЫ И ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ <i>IN VITRO</i></b><br>Лупанова И.А. в.н.с., отд. экспериментальной фармакологии |  |         |   |                 |
| Составлена:   | _____  |         |   | Дата 11.01.2022 |
|   |  | подпись |   |                 |
| Рассмотрена:  | Ферубко Е.В., зав. отд. экспериментальной фармакологии |         |   | Дата 11.01.2022 |
|   |  | подпись |  |                 |
| Утверждена:   | Мизина П.Г., заместитель директора                     |         |   | Дата 11.01.2022 |
|   |  | подпись |  |                 |

## 1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, включённые в биокolleкцию (БК) ФГБНУ ВИЛАР, разработаны для исследований при определении специфической биологической активности экстрактов, фракций, индивидуальных веществ, субстанций из нативного и биотехнологического сырья. БК поддерживается постоянно.

1.2. Данная СОП описывает процедуру изучения антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств биологически активных веществ и фармацевтических композиций на их основе с применением специфической ферментной биотест-систем (СФБТС) на основе комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе каталазы (КАТ) и глутатионредуктазы (ГР) *in vitro*.

## 2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

2.1. СОП предназначена для сотрудников (согласно Приложению 1), выполняющих манипуляции по изучению антиоксидантных, адаптогенных и антимикробных свойств объектов исследования (экстракты, субстанции, фракции, индивидуальные вещества/группы веществ из них) с применением комбинированной СФБТС на основе КАТ и ГР.

**Приложение К.**  
**СОП «Определение иммуномодулирующих свойств растительных биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе НАДФН-оксидазы *in vitro*»**

| Отдел экспериментальной фармакологии ФГБНУ ВИЛАР |                 |                              |                              |             |
|--|-----------------|------------------------------|------------------------------|-------------|
| СОП №<br>02.01.040.2022                          | Номер версии: 1 | Начало действия:<br>17.01.22 | Действителен до:<br>17.01.24 | стр. 1 из 6 |

|  |  |         |  |                 |
|--|--|---------|--|-----------------|
| <p><b>Стандартная операционная процедура</b><br/> <b>ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ</b><br/> <b>РАСТИТЕЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С</b><br/> <b>ПРИМЕНЕНИЕМ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФЕРМЕНТНОЙ БИОТЕСТ-</b><br/> <b>СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ НАДФН-ОКСИДАЗЫ <i>in vitro</i></b><br/>         Лупанова И.А. в.н.с., отд. экспериментальной фармакологии</p> |  |         |  |                 |
| Составлена:  |  | подпись |  | Дата 17.01.2022 |
| Рассмотрена:   | Ферубко Е.В., зав. отд. экспериментальной фармакологии | подпись |  | Дата 17.01.2022 |
| Утверждена:  | Мизина П.Г., заместитель директора                     | подпись |  | Дата 17.01.2022 |

**1 ЦЕЛЬ:**

- 1.1. Данная стандартная операционная процедура устанавливает порядок проведения исследования иммуномодулирующих свойств биологически активных соединений в опытах *in vitro* с применением НАДФ-оксидазной биотест-системы с использованием биохимического анализатора.

**2 ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:**

- 2.1 СОП предназначена сотрудникам, выполняющим манипуляции по изучению иммуномодулирующих свойств биологически активных соединений *in vitro* с применением НАДФН-оксидазной биотест-системы с использованием биохимического анализатора. Сотрудники должны обеспечивать правильную постановку анализа и получение достоверных экспериментальных данных.

**3 ОПИСАНИЕ**

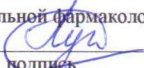
**3.1. Материалы и оборудование:**

- 3.1.1. Стекланный гомогенизатор Поттера-Элвегейма с зазором 10 мкм;
- 3.1.2. Центрифуга скоростная с охлаждением (тип К-24 П, Россия);
- 3.1.3. Биохимический анализатор Clima 15 (Испания);
- 3.1.4. рН-метр-милливольтметр рН-410 (НПКФ Аквилон, Россия);
- 3.1.5. Электронные аналитические весы (ER-182 А, Россия);
- 3.1.6.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  марки «хч»;
- 3.1.7.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  марки «хч»;
- 3.1.8. НАДФН ( $\beta$ -никотинамедадениндинуклеотидфосфат восстановленный), «Merck Life Science» (Германия);
- 3.1.9. Пробирки типа эппендорф;
- 3.1.10. Исследуемое вещество;
- 3.1.11. Препарат сравнения;
- 3.1.12. Клетки крови кролика.

**3.2. Нормативные ссылки**

**Приложение Л.**  
**СОП «Определение антитоксических свойств растительных биологически активных веществ с применением комбинированной специфической ферментной биотест-системы на основе цитохрома P450 и глутатионтрансферазы *in vitro*»**

| Отдел экспериментальной фармакологии ФГБНУ ВИЛАР |                 |                  |                  |             |
|--|-----------------|------------------|------------------|-------------|
| СОП №  | Номер версии: 1 | Начало действия: | Действителен до: | стр. 1 из 6 |
| 02.01.041.2022                                   |                 | 14.01.22         | 14.01.24         |             |

| Стандартная операционная процедура   |   |  |  |                 |
|--|---|--|--|-----------------|
| <b>ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РАСТИТЕЛЬНЫХ</b><br><b>БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С ПРИМЕНЕНИЕМ</b><br><b>КОМБИНИРОВАННОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФЕРМЕНТНОЙ БИОТЕСТ-</b><br><b>СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ЦИТОХРОМА P450 И</b><br><b>ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗЫ <i>in vitro</i></b><br>Лупанова И.А. в.н.с., отд. экспериментальной фармакологии |   |  |  |                 |
| Составлена:  | <br>подпись |  |  | Дата 14.01.2022 |
| Рассмотрена:   | Ферубко Е.В., зав. отд. экспериментальной фармакологии<br>подпись                             |  |  | Дата 14.01.2022 |
| Утверждена:  | Мизина П.Г., заместитель директора<br>подпись   |  |  | Дата 14.01.2022 |

**1 ЦЕЛЬ:**

1.1. Данная стандартная операционная процедура устанавливает порядок проведения исследования по выявлению гепатопротекторных соединений антитоксической направленности в условиях опыта *in vitro*.

**2 ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:**

2.1 СОП предназначена сотрудникам, выполняющим манипуляции по выявлению гепатопротекторных соединений антитоксической направленности в условиях опыта *in vitro*. Сотрудники должны обеспечивать правильную постановку анализа и получение достоверных экспериментальных данных.

**3 ОПИСАНИЕ**


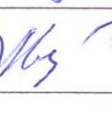

**3.1. Оборудование и реактивы:**

- 3.1.1. Стекланный гомогенизатор Поттера-Элвегейма;
- 3.1.2. Центрифуга скоростная (тип Higt-speed);
- 3.1.3. Спектрофотометр двулучевой двуволновой, регистрирующий MPS-2000;
- 3.1.4. рН-метр-милливольтметр рН-410 (НПКФ Аквилон);
- 3.1.5. Электронные аналитические весы (ER-182 А);
- 3.1.6. Холодильная камера;
- 3.1.7. Дозаторы одноканальные объемом 20-100мкл и 100-1000 мкл;
- 3.1.8. КСl ХЧ или ЧДА;
- 3.1.9. Этилендиаминтетрауксусной кислоты натриевая соль (ЭДТА);
- 3.1.10. NaOH ХЧ или ЧДА;
- 3.1.11. К, Na-виннокислый, кислый;
- 3.1.12. Дитиотреитол;
- 3.1.13. Дезоксихолат натрия;
- 3.1.14. Анилин;
- 3.1.15. Диметилаланин;



**Приложение М.**  
**«Определение скорости тирозингидроксилазной реакции методом прямого спектрофотометрического измерения»**

Отдел экспериментальной фармакологии ФГБНУ ВИЛАР

|   |   |                             |   |             |
|---|---|-----------------------------|---|-------------|
| СОП №: 02.01.042.2022   | Номер версии: 1   | Начало действия: 01.09.2022 | Действителен до: 30.08.2023   | стр. 1 из 5 |
| <b>Стандартная операционная процедура</b><br><b>Определение скорости тирозингидроксилазной реакции методом прямого спектрофотометрического измерения.</b> |   |                             |   |             |
| Составлено:   | Лупанова И.А., в.н.с. отд. Экспериментальной фармакологии |                             |  | 26.08.2022  |
| Рассмотрено:  | Ферубко Е.В., зав. отд.                                   |                             |  | 29.08.2022  |
| Утверждено:   | Мизина П.Г., заместитель директора                        |                             |   | 30.08.2022  |

### 1 ЦЕЛЬ:

1.1. Данная стандартная операционная процедура устанавливает порядок проведения исследования по определению скорости тирозингидроксилазной реакции методом прямого спектрофотометрического измерения.

### 2 ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

2.1 СОП предназначена сотрудникам, выполняющим манипуляции по изучению свойств биологически активных соединений с применением специфической ферментной биотест-системы *in vitro* (СФБТС) на основе ключевого фермента дофаминовой нейромедиаторной системы тирозингидроксилазы (ТГ). Сотрудники должны обеспечивать правильную постановку анализа и получение достоверных экспериментальных данных.

### 3 ОПИСАНИЕ

#### 3.1. Материалы и оборудование:



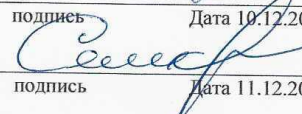
- 3.1.1. Стекланный гомогенизатор Поттера-Элвегейма с зазором 10 мкм;
- 3.1.2. Центрифуга скоростная с охлаждением (тип К-24 П);
- 3.1.3. Биохимический анализатор Сііma 15;
- 3.1.4. рН-метр-милливольтметр рН-410 (НПКФ Аквилон);
- 3.1.5. Электронные аналитические весы (ER-182 А);
- 3.1.6. Гидроксиметиламинометан (трис);
- 3.1.7. Малеиновая кислота;
- 3.1.8. Каталаза;
- 3.1.9. Эмоксипин (3-окси-6-метил-2-этил- пиридина гидрохлорид);
- 3.1.10. HCl марки «хч»;



## Приложение Н.

### СОП «Определение противовоспалительных свойств растительных биологически активных веществ с применением специфической ферментной биотест-системы на основе индуцибельной NO-синтазы (iNOS) *in vitro*»

| Отдел экспериментальной фармакологии ФГБНУ ВИЛАР |  |                              |                              |              |
|--|--|------------------------------|------------------------------|--------------|
| СОП №:<br>02.01.038.2021                         | Номер версии: 2<br>Вводится взамен<br>СОП №:<br>02.01.038.2021<br>(версия 1) | Начало действия:<br>12.12.24 | Действителен до:<br>12.12.29 | стр. 1 из 11 |

| Стандартная операционная процедура  |  |
|---|--|
| <b>ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ<br/>БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ С ПРИМЕНЕНИЕМ<br/>СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФЕРМЕНТНОЙ БИОТЕСТ-СИСТЕМ НА ОСНОВЕ<br/>ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ NO-СИНТАЗЫ (iNOS) <i>in vitro</i></b><br>Лупанова И.А. в.н.с., отд. экспериментальной фармакологии |  |
| Составлена:   | <br>подпись Дата 10.12.2024  |
| Рассмотрена:  | Ферубко Е.В., зав. отд. экспериментальной фармакологии<br><br>подпись Дата 10.12.2024 |
| Утверждена:   | Семкина О.А., заместитель директора<br><br>подпись Дата 11.12.2024                    |

#### ВВЕДЕНИЕ

1.1. Специфические ферментные биотест-системы *in vitro*, включённые в биокolleкцию (БК) ФГБНУ ВИЛАР, разработаны для скрининговых исследований при определении специфической биологической активности экстрактов, фракций, индивидуальных веществ, субстанций из нативного и биотехнологического сырья. БК поддерживается постоянно.

1.2. Данная СОП описывает процедуру изучения противовоспалительных свойств биологически активных веществ и фармацевтических композиций на их основе с применением специфической ферментной биотест-систем (СФБТС) на основе индуцибельной NO-синтазы (iNOS) *in vitro*.

#### 2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

2.1. СОП предназначена для сотрудников (согласно Приложению 1), выполняющих манипуляции по изучению тиреотропных свойств объектов исследования (экстракты, субстанции, фракции, индивидуальные вещества/группы веществ из них) с применением противовоспалительной СФБТС.

## Приложение П.

### СОП «Определение венотонизирующих свойств биологически активных веществ с применением комплекса специфических ферментных биотест-систем *in vitro*»

| Отдел экспериментальной фармакологии ФГБНУ ВИЛАР  |  |                             |                                |             |
|---|--|-----------------------------|--------------------------------|-------------|
| СОП №:<br>02.01.043.2023  | Версия документа:<br>СОП №:<br>02.01.043.2023<br>(версия 1)  | Начало действия: 05.09.2024 | Действителен до:<br>05.09.2029 | стр. 1 из 8 |
| <b>Стандартная операционная процедура</b>   |  |                             |                                |             |
| <b>Определение венотонизирующих свойств биологически активных веществ с применением комплекса специфических ферментных биотест-систем <i>in vitro</i></b> |  |                             |                                |             |
| Составлено:   | <br>Лупанова Н.А., в/с отдела<br>экспериментальной фармакологии |                             | 04.08.2024<br>Дата             |             |
| Рассмотрено:  | <br>Ферубко Е.В., зав. отд.                                    |                             | 04.08.24<br>Дата               |             |
| Утверждено:   | <br>Семкина О.А., зам. директора                              |                             | 04.08.24<br>Дата               |             |

#### 1 ЦЕЛЬ:

1.1. Данная стандартная операционная процедура устанавливает порядок проведения исследования венотонизирующих свойств биологически активных веществ с применением комплекса специфических ферментных биотест-систем *in vitro*.

#### 2 ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

2.1 СОП предназначена сотрудникам, выполняющим манипуляции по изучению венотонизирующих свойств биологически активных веществ с применением комплекса специфических ферментных биотест-систем *in vitro*. Сотрудники должны обеспечивать правильную постановку анализа и получение достоверных экспериментальных данных.

#### 3 ОПИСАНИЕ:

##### 3.1. Материалы и оборудование:

- 3.1.1. Биохимический анализатор Clima MC-15;
- 3.1.2. pH-метр-милливольтметр pH-410 (ИПКФ Аквилон);
- 3.1.3. Электронные аналитические весы (ER-182 A);
- 3.1.4. Термостат;
- 3.1.5. Дозаторы автоматические переменного объема;
- 3.1.6. Холодильник;
- 3.1.7. Гидроксиметилциклометан (триол);

**Приложение Р.**  
**Методические рекомендации по применению специфических ферментных биотест-систем *in vitro* при исследовании биологической активности растительных объектов**



Федеральное государственное бюджетное научное  
учреждение  
«Всероссийский научно-исследовательский институт  
лекарственных и ароматических растений»  
(ФГБНУ ВИЛАР)

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель директора по научной  
работе ФГБНУ ВИЛАР,  
д-р фармацевт. наук, профессор

 П.И. Мизина  
«15» апреля 2022 г.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

по применению специфических ферментных биотест-систем *in vitro* при  
исследовании биологической активности растительных объектов  
рег. № М-04868244-95-2022 от 23.03.2022

Руководитель Центра  
доклинических исследований,  
кандидат биологических наук



И.А. Лушинова

Москва – 2022 г.

**Приложение С.  
Патент на изобретение № 2676085 от 26.12.2018**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 676 085** <sup>(13)</sup> **C1**

(51) МПК  
*A61K 36/28* (2006.01)  
*A61K 9/20* (2006.01)  
*B01D 11/02* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК

*A61K 36/28* (2018.08); *A61K 9/20* (2018.08); *B01D 11/02* (2018.08); *A61K 2121/00* (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2018109888, 21.03.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
21.03.2018Дата регистрации:  
26.12.2018

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 21.03.2018

(45) Опубликовано: 26.12.2018 Бюл. № 36

Адрес для переписки:

117216, Москва, ул. Грина, д.7, руководителю  
ФГБНУ ВИЛАР

(72) Автор(ы):

Мизина Прасковья Георгиевна (RU),  
 Сидельников Николай Иванович (RU),  
 Гуленков Александр Сергеевич (RU),  
 Крепкова Любовь Вениаминовна (RU),  
 Лупанова Ирина Александровна (RU),  
 Дул Вячеслав Николаевич (RU),  
 Фатеева Татьяна Владимировна (RU),  
 Стрелкова Людмила Борисовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 научное учреждение Всероссийский  
 научно-исследовательский институт  
 лекарственных и ароматических растений  
 (ФГБНУ ВИЛАР) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете

о поиске: RU 1561262 C, 30.10.1994. RU  
 2403908 C1, 20.11.2010. RU 2188662 C1,  
 10.09.2002. RO 128713 A2, 30.08.2013. RU  
 2039566 C1, 20.07.1995.

(54) Способ получения растительного средства противовоспалительного и антимикробного действия

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к способу получения препарата в форме таблеток для рассасывания на основе смеси водно-спиртовых экстрактов ромашки аптечной, календулы лекарственной, тысячелистника обыкновенного. Способ получения препарата в форме таблеток для рассасывания на основе смеси водно-спиртовых экстрактов ромашки аптечной, календулы лекарственной, тысячелистника обыкновенного, взятых в соотношении 2:1:1, полученных экстракцией лекарственных растений 40% этиловым спиртом, при этом к 1000 г смеси водно-спиртовых экстрактов лекарственных растений добавляют 572,74 г микрокристаллической целлюлозы при перемешивании и температуре не

более 35°C до влажности 40±1%, затем добавляют 30-90 г предварительно приготовленной смеси коллоидного кремния диоксида с эфирным маслом мяты или цитрусовых, взятых в соотношении 1:0,5, в полученную реакционную массу добавляют отдельно приготовленную структурообразующую основу, выбранную из смеси D-маннитола, L-гидроксипропицеллюлозы и поливинилового спирта, взятых в равных количествах, или O-α-D-глюкопиранозил-D-маннита в количестве до массы 1980-5940 г, полученную массу перемешивают при температуре не более 35°C до получения влажности 6±1% с последующим добавлением 20-60 г магния стеарата или кальция стеарата и полученную однородную массу таблетуют



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 771 028**<sup>(13)</sup> **C1**

(51) МПК  
*A61K 36/28* (2006.01)  
*B01D 11/02* (2006.01)  
*A61K 127/00* (2006.01)  
*A61P 1/16* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК  
*A61K 36/28* (2022.02); *B01D 11/02* (2022.02); *A61P 1/16* (2022.02); *A61K 2121/00* (2022.02)

(21)(22) Заявка: 2020143146, 25.12.2020  
 (24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 25.12.2020  
 Дата регистрации:  
 25.04.2022  
 Приоритет(ы):  
 (22) Дата подачи заявки: 25.12.2020  
 (45) Опубликовано: 25.04.2022 Бюл. № 12  
 Адрес для переписки:  
 117216, Москва, ул. Грина, 7, директору  
 ФГБНУ ВИЛАР

(72) Автор(ы):  
 Сайбель Ольга Леонидовна (RU),  
 Радимич Андрей Иванович (RU),  
 Даргаева Тамара Даржаповна (RU),  
 Бабенко Александра Николаевна (RU),  
 Боровкова Марина Вячеславовна (RU),  
 Курманова Елена Николаевна (RU),  
 Крепкова Любовь Вениаминовна (RU),  
 Ферубко Екатерина Владимировна (RU),  
 Лупанова Ирина Александровна (RU),  
 Мизина Прасковья Георгиевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):  
 Федеральное государственное бюджетное  
 научное учреждение "Всероссийский  
 научно-исследовательский институт  
 лекарственных и ароматических растений"  
 (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: AKRAM JAMSHIDZADEHA et al,  
 Hepatoprotective Activity of Cichorium intybus  
 L. Leaves Extract Against Carbon Tetrachloride  
 Induced Toxicity // Iranian Journal of  
 Pharmaceutical Research, 2006, 1: 41-46.  
 KHODADADI MI et al, The Effect of Cichorium  
 intybus L. Ethanol Extraction on the Pathological  
 and Biomedical Indexes of the Liver and Kidney  
 of (см. прод.)

(54) Способ получения средства, обладающего гепатопротекторным и антигепатотоксическим действием

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к средству, обладающему гепатопротекторным и антигепатотоксическим действием, и способу его получения. Способ получения средства, обладающего гепатопротекторным и антигепатотоксическим действием, включающий экстракцию растительного сырья, очистку и сушку, причем в качестве растительного сырья используют измельченную высушенную траву

дикорастущего цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) с размером частиц 3-5 мм, трехкратную динамическую экстракцию спиртом этиловым 50-70% об. в соотношении 1:10 при температуре 40-60°C в течение 1-1,5 ч, фильтрование, концентрирование объединенного извлечения, очистку органическим растворителем, выбранным из группы, включающей дихлорметан, дихлорэтан, хлороформ, и сушку при температуре 40-60°C. Средство, обладающее

RU 2771028 C1

RU 2771028 C1

**Приложение У.  
Патент на изобретение № 2802434 от 28.08.2023**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 802 434<sup>(13)</sup> C1**

(51) МПК  
*A61K 36/725* (2006.01)  
*A61K 131/00* (2006.01)  
*A61P 1/04* (2006.01)  
*A61P 29/00* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК  
*A61K 36/725* (2023.05); *A61P 1/04* (2023.05); *A61P 29/00* (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2022122628, 23.08.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
23.08.2022

Дата регистрации:  
28.08.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 23.08.2022

(45) Опубликовано: 28.08.2023 Бюл. № 25

Адрес для переписки:

141100, Московская обл., г. Щелково, пл.  
Ленина, 1, кв. 183, Князева Любовь  
Александровна

(72) Автор(ы):

Семкина Ольга Александровна (RU),  
 Асатуров Юрий Владимирович (RU),  
 Джавахян Марина Аркадьевна (RU),  
 Лупанова Ирина Александровна (RU),  
 Ферубио Екатерина Владимировна (RU),  
 Курманова Елена Николаевна (RU),  
 Мизина Прасковья Георгиевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 научное учреждение Всероссийский  
 научно-исследовательский институт  
 лекарственных и ароматических растений  
 (ФГБНУ ВИЛАР) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: CHOWDARI et al. Anti-  
 Inflammatory, Antulcer and Anticancer  
 Activities of Saponin Isolated from the Fruits of  
 Ziziphus jujube // The Natural Products Journal,  
 Volume 10, Number 4, 2020, pp. 395-399(5). CN  
 113388473 A, 14.09.2021. RU 2711048 C1,  
 14.01.2020. RU 2548756 C2, 20.04.2015.

**(54) СМЕСЬ ЭКСТРАКТОВ ПЛОДОВ ZIZIPHUS JUJUBE MILL., ОБЛАДАЮЩАЯ ПРОТИВОЯЗВЕННЫМ, ПРОТИВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ ДЕЙСТВИЯМИ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности, а именно к смеси экстрактов плодов *Ziziphus jujube* Mill., обладающей противоязвенной и противовоспалительной активностью. Смесь экстрактов плодов *Ziziphus jujube* Mill., обладающая противоязвенной и противовоспалительной активностью, содержащая: докритический CO<sub>2</sub> - экстракт плодов зизифуса обыкновенного, стандартизированный по сквалену с содержанием сквалена не менее 0,8 масс. %; спиртовой экстракт плодов зизифуса обыкновенного, стандартизированный по сумме флавоноидов с

содержанием суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 0,3 масс. %; густой экстракт плодов зизифуса обыкновенного, стандартизированный по сумме тритерпеновых сапонинов с содержанием суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на агликон не менее 2,0 масс. %; сухой экстракт плодов зизифуса обыкновенного, стандартизированный по сумме полисахаридов с содержанием суммы полисахаридов не менее 65,0 масс. %; в соотношении экстрактов 6:27:27:40, причем докритический CO<sub>2</sub> экстракт плодов зизифуса обыкновенного получен при 65 МПа 23-28°C; спиртовой экстракт плодов зизифуса

Стр. 1

RU 2 802 434 C 1

RU 2 802 434 C 1