

На правах рукописи



**Лужанин
Владимир Геннадьевич**

**МЕТОДОЛОГИЯ ПОИСКА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ
КАНДИДАТОВ НА ОСНОВЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ
РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Санкт-Петербург

2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

Самылина Ирина Александровна доктор фармацевтических наук, профессор, член-корреспондент РАН

Официальные оппоненты:

Зилфикаров Ифрат Назимович доктор фармацевтических наук, профессор РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», главный научный сотрудник отдела химии природных соединений

Ханина Миниса Абдуллаевна доктор фармацевтических наук, профессор, государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет», заведующая кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии

Марахова Анна Игоревна доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, профессор института биохимической технологии и нанотехнологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «25» июня 2024 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте организации (<https://sites.google.com/a/pharminnotech.com/dissovet>).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 21.2.063.01,
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Поиск новых лекарственных средств на основе биологически активных веществ растений традиционно является актуальным направлением фармацевтических исследований и разработок. Фитопрепараты, обладая полимодальной терапевтической активностью, способны воздействовать сразу на несколько различных звеньев патогенеза, а широкий диапазон терапевтических доз в сочетании с относительно низкой токсичностью обуславливает их эффективность и безопасность (Самбукова Т. В. и др., 2017).

Природные источники биологически активных молекул отличаются более высоким химическим разнообразием по сравнению с веществами синтетического и биотехнологического происхождения, что в сочетании с современными методами физико-химического анализа, возможностями осуществления компьютерного прогноза фармакологической активности *in silico* отдельных молекул и развитием методов исследования *in vitro* обеспечивает основу для направленного поиска биологически активных комплексов и индивидуальных соединений растительного происхождения. Кроме того, важными факторами, определяющими приоритет изучения лекарственного растительного сырья, являются доступность, биоразнообразие и возобновляемость природных ресурсов Российской Федерации, а также значительный объем накопленных знаний в области фармакогнозии, фитомедицины и этнофармакологии (Лужанин В. Г. и др., 2023). Так, за период с 1981 по 2016 г. среди всех зарегистрированных в мире новых лекарственных средств, доля средств растительного происхождения составила около 33 % (Newman D. J et al., 2016; Newman D. J et al., 2020). Порядка 50 % лекарственных препаратов разработаны на основе соединений, впервые идентифицированных или выделенных из растений (Newman D. J et al., 2000). Доля зарегистрированных в Российской Федерации препаратов растительного происхождения составляет порядка 20 % от общего числа зарегистрированных лекарств (Акамова А. В. и др., 2017; Сафонова Н. В. и др., 2021).

Наряду с многокомпонентными экстракционными фитопрепаратами и лекарственным растительным сырьем, на отечественном фармацевтическом рынке также присутствуют высокоочищенные препараты и препараты на основе индивидуальных веществ, однако доля последних двух групп составляет лишь 5 и 1,9 %, соответственно (Бойко Н. Н. и др., 2017), что обусловлено высокой трудоемкостью их препаративного выделения и очистки.

Разработка новых фитопрепаратов сопряжена с целым рядом трудностей и проблем. Так, для суммарных экстракционных препаратов необходимо устанавливать группы биологически активных веществ, проявляющих основное терапевтическое действие, и разрабатывать для них методики стандартизации, а наличие соэкстрактивных веществ в полной мере снижает степень выраженности их фармакологического эффекта. Кроме того, установление фармакологической мишени и механизма действия лекарственного препарата растительного происхождения, представляющего собой сумму

действующих веществ, крайне затруднительно и является в настоящее время существенным ограничивающим фактором современной лекарственной разработки.

Выделение индивидуальных соединений из суммарных экстрактов с последующим прогнозированием их активности методом *in silico* и подтверждением в экспериментах *in vitro* позволяет осуществить эффективный скрининг перспективных молекул, сократить время и средства для определения молекулярных мишеней, механизмов действия, достоверно оценить фармакокинетические параметры и их потенциальную токсичность (Shaker B. et al., 2021).

Таким образом, с учетом требований современных надлежащих фармацевтических практик, актуальной задачей современной фармации является поиск новых лекарственных кандидатов на основе индивидуальных соединений растительного происхождения, что позволяет проводить фармацевтическую разработку лекарственных средств с высокой степенью доказательности.

Степень разработанности темы исследования. Объекты исследования, представленные надземными частями *Empetrum nigrum* L., *Iris lactea* Pall., *Ononis arvensis* L., *Solidago canadensis* L. и листьями *Rubus chamaemorus* L., частично изучены по химическому составу и фармакологической активности.

Ранее были исследованы липофильные компоненты листьев *Empetrum nigrum* – халконы, дигидрохалконы, производные бибензила, тритерпеноидов производных урсоловой и олеаноловой кислот, уваола и эритродиола (Toiron C. et al., 1995; Wollenweber E. et al., 1992). Из хлороформной фракции выделены производное флавонона: 6,8-диметилпиноцембрин и 2'-метокси-4'-гидрокси-альфа, бета-дигидрохалкон (Krasnov E. A. et al., 2000). В 70 %-м этанольном экстракте выявлены кверцетин, гиперозид, изокверцитрин, авикулярин (Василец В. Н. и др., 1988). Для суммарных экстрактов *Empetrum nigrum* отмечена противосудорожная, противотуберкулезная, антимикробная, антиоксидантная и другие виды активности (Саратиков А. С. и др., 1991; Li H. et al., 2015; Bezverkhniaia E. A. et al., 2023).

В листьях *Rubus chamaemorus* установлено наличие мономеров, димеров, тримеров и тетрамеров эллаготаннинов, выявлено присутствие антоцианов, фенолокислот и флавоноидов (Kähkönen M. et al., 2012), описаны противомикробные свойства в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (Нилова Л. П. и др., 2017; Rauha J. P. et al., 2000).

Трава *Iris lactea* содержит фенолкарбоновые кислоты (феруловую, цис-п-кумаровую, транс-п-кумаровую, кофейную, хлорогеновую и др.), флавоноиды (лютеолин, апигенин, гомоориентин, сверцияяпонин, эмбинин и его производные), ксантоны (мангиферин и изомангиферин), производные стильбена, высшие жирные кислоты. Суммарные экстракты травы *Iris lactea* обладают нефропротективной, антигипоксической, антиоксидантной и противовирусной активностью (Буданцев А. Л., 2014; Kim H. W. et al., 2020).

В надземной части *Ononis arvensis* обнаружены изофлавоноиды (формонетин, дайдзеин), фенолкарбоновые кислоты (вератровая, галловая, гентизиновая, кофейная, п-

гидроксibenзойная, п-кумаровая, п-кумароилхинная, сиреневая и хлорогеновая), арабиноглюкогалактаны, тритерпеновые соединения, β -ситостерол, аминокислоты, макро- и микроэлементы (Давитавян Н. А. и др., 2017; Тулайкин А. И. и др., 2007). Установлена антибактериальная и противогрибковая активность суммарных экстрактов из надземной части *Ononis arvensis* (Dénes T. et al., 2017).

Трава *Solidago canadensis* содержит тритерпеновые соединения, дитерпены, сесквитерпены, фенольные гликозиды, лигнаны (8-дегидроксиметилвизанол, 9-альдегидвизанол, визанол), 9-O-[3-O-ацетил-b-D-глюкопиранозил]-4-гидроксикоричную кислоту (Huang Y. et al., 2013). Суммарные экстракты из надземной части *Solidago canadensis* обладают противовоспалительной, антибактериальной и антиоксидантной активностью (Сулейманова Ф. Ш. и др., 2020).

Таким образом, для всех вышеуказанных объектов ранее были проведены общие фитохимические исследования, преимущественно по основным группам соединений, а также несистемные исследования некоторых видов фармакологической активности их суммарных экстрактов. Методология разработки новых фитопрепаратов предполагает использование алгоритма комплексного последовательного применения различных междисциплинарных методов исследований, позволяющего осуществить обоснованный выбор перспективных лекарственных кандидатов. Целенаправленного выделения индивидуальных соединений и установления их химической структуры, построения теоретически обоснованных прогностических моделей фармакологической активности данных структур *in silico* с последующим фармакологическим скринингом *in vitro* для доказательного выбора наиболее перспективных кандидатов и последующей фармацевтической разработки для данных объектов ранее не проводилось.

Цель диссертационной работы. Разработать методологию поиска перспективных лекарственных кандидатов путем алгоритмизации процессов выделения и изучения индивидуальных веществ из растительного сырья.

Задачи исследования:

1. Предложить критерии и обосновать выбор растительных объектов и методов комплексного экспериментального исследования.
2. Выделить индивидуальные соединения из объектов исследования и определить их химическую структуру современными физико-химическими методами анализа; сформировать реестр выделенных индивидуальных соединений.
3. Провести оценку потенциала биологической активности выделенных индивидуальных соединений *in silico* (Way2Drug + SwissPredict) и определить наиболее перспективную систему организма человека для изучения действия исследуемых молекул на наибольшее количество вероятных мишеней и последующего фармакологического скрининга.
4. Провести скрининг потенциальной фармакологической активности молекул выделенных индивидуальных веществ *in silico* (SwissPredict), анализируя вероятные сочетанные эффекты на большинство мишеней в исследуемых метаболических путях, для

прогностического определения целевой группы перспективных лекарственных кандидатов.

5. Провести скрининг фармакологической активности выделенных индивидуальных веществ и суммарных экстрактов на моделях системы гемостаза организма человека *in vitro* для экспериментального определения целевой группы перспективных лекарственных кандидатов.

6. Изучить взаимное влияние лекарственных кандидатов-лидеров при эквимольном смешении на фармакологическую активность на моделях системы гемостаза организма человека *in vitro*.

7. На основании полученных эмпирических данных сформулировать основные принципы и выработать базовый алгоритм предлагаемой методологии поиска потенциальных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения.

Научная новизна исследования. Впервые предложена методология поиска потенциальных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения. Впервые из травы *Iris lactea* препаративно выделены 8 производных С-гликозидов флавоноидов (из них 4 новых природных соединения), 1 производное ксантона; из травы *Solidago canadensis* выделены 4 производных флавоноидов; из листьев *Rubus chamaemorus* выделены 3 производных гликозидов глюкоуроновых кислот, 2 таннина (из них 1 новое природное соединение); из травы *Ononis arvensis* выделены 1 производное флавоноидов и 2 производных изофлавоноидов; из побегов *Empetrum nigrum* выделены 1 производное флавоноидов, 3 таннина, 3 производных бибензила (из них 1 новое природное соединение), 4 производных 9,10-дигидрофенантрена (из них 1 новое природное соединение), 4 производных дигидрохалконов (из них 1 новое природное соединение), 2 производных халкона. Таким образом, из исследуемых растений впервые выделены и идентифицированы 38 индивидуальных соединений, 8 из которых являются новыми природными.

Впервые проведено сочетанное (Way2Drug + SwissPredict) компьютерное моделирование и осуществлен прогноз фармакологической активности *in silico* 38 выделенных индивидуальных соединений.

Впервые исследовано влияние суммарных экстрактов и растворов индивидуальных соединений, выделенных из надземных частей *Empetrum nigrum*, *Iris lactea*, *Ononis arvensis*, *Solidago canadensis* и листьев *Rubus chamaemorus*, в сравнении с референтными веществами (гепарином натрия, ацетилсалициловой кислотой, пентоксифиллином) на систему гемостаза человека (процессы коагуляции, активации и агрегации тромбоцитов плазмы донорской крови) в условиях *in vitro* и установлены соединения-лидеры для последующей фармацевтической разработки.

Впервые изучено взаимное влияние соединений-лидеров при эквимольном смешении на фармакологическую активность на моделях системы гемостаза организма человека *in vitro*.

Получены 4 патента РФ и 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ:

– Патент RU 2806331 «Применение 1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-(3-гидроксифенил)-этана в качестве средства, обладающего антиагрегационной активностью»;

– Патент RU 2808460 «Применение 2,3,4-триметокси-5-гидрокси-9,10-дигидрофенантрена в качестве средства, обладающего антиагрегационной активностью»;

– Патент RU 2812630 «Применение 5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванона в качестве средства, обладающего антиагрегационной активностью»;

– Патент RU 2811240 «Применение 4-о- α -арабинофуранозилэллаговой кислоты в качестве средства, обладающего антиагрегационной активностью»;

– Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ RU 2023680120 «Численный симулятор активации тромбоцитов».

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты экспериментальных исследований позволили разработать базовый алгоритм и сформулировать основные принципы поиска потенциальных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения, что обеспечивает переход от традиционного изучения лекарственного растительного сырья как лекарственного средства, к изучению лекарственного растительного сырья как источника биологически активных молекул. Также результаты исследований фармакологической активности *in vitro* на моделях системы гемостаза организма человека показали преимущественную эффективность индивидуальных веществ над их суммой в виде экстракта или эквимолярных смесей. В целом результаты изучения индивидуальных веществ позволяют рассматривать их в качестве потенциальных лекарственных кандидатов и формулировать актуальные научно-практические задачи по разработке новых методик стандартизации лекарственного растительного сырья по содержанию индивидуальных веществ, разработке промышленных регламентов по культивированию и заготовке лекарственного растительного сырья для направленного увеличения содержания в нем целевых веществ, разработке промышленных регламентов по выделению индивидуальных соединений из растительного сырья, методик их химического воспроизведения и модификации.

Разработаны 38 паспортов субстанций для выделенных индивидуальных соединений, которые содержат физико-химические характеристики веществ и данные компьютерного прогноза их фармакологической активности, что позволило сформировать реестр индивидуальных веществ фенольной природы. В результате последовательных экспериментов по скринингу фармакологической активности из 38 выделенных индивидуальных соединений определены 4 наиболее перспективных лекарственных кандидата с целью последующей фармацевтической разработки средств для лечения заболеваний сердечно-сосудистой и кровеносной систем: 1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-(3-гидроксифенил)-этан; 2,3,4-триметокси-5-гидрокси-9,10-дигидро-

фенантрен; 5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванон; 4-о- α -арабинофуранозилэллаговая кислота.

Методика выделения из растительного сырья индивидуальных веществ, обладающих лекарственным потенциалом и относящихся к производным бибензила, 9,10-дигидрофенантрена и дигидрохалконов, внедрена в учебный процесс ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (г. Пермь) (акт от 30 августа 2023 г.). Разработанная методология поиска перспективных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения внедрена в научный процесс ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (г. Санкт-Петербург) (акт от 29 января 2024 г.). Алгоритм выбора перспективных для фармацевтической разработки молекул и их сочетаний на основе анализа результатов прогностического моделирования внедрен в производство АО «Фармпроект» (г. Санкт-Петербург) (акт от 14 ноября 2023 г.). Методика выделения индивидуальных производных С-гликозидов флавоноидов и ксантонов из травы *Iris lactea* внедрена в производство ООО «Тенториум» (г. Пермь) (акт от 25 января 2024 г.).

Методология и методы исследования. Исследования проводились в период с 2013 по 2024 г. Выделение индивидуальных соединений осуществляли методами колоночной хроматографии и препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), текущий анализ химического состава фракций проводили методами высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) и ВЭЖХ с ультрафиолетовым детектором. Установление структуры выделенных соединений проводили методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрии высокого разрешения. Компьютерный прогноз фармакологической активности исследуемых молекул осуществляли при помощи сервисов Way2Drug и SwissPredict. Изучение влияния выделенных индивидуальных соединений на систему гемостаза человека проводили методами *in vitro*. Теоретическую основу исследования составляли труды зарубежных и отечественных ученых по фитохимическому анализу вторичных метаболитов растений, относящихся к группе фенольных соединений. Методология исследования заключалась в выделении индивидуальных веществ из изучаемого сырья, установлении их химической структуры, фармакологическом скрининге методами *in silico* и *in vitro*, отборе наиболее перспективных для последующей фармацевтической разработки кандидатов-лидеров.

Положения, выносимые на защиту.

1. Критерии выбора растительных объектов, дизайн и методы комплексного экспериментального исследования.

2. Результаты выделения, изучения и идентификации индивидуальных фенольных соединений из объектов исследования; реестр выделенных индивидуальных соединений.

3. Результаты оценки потенциала биологической активности выделенных индивидуальных соединений *in silico* (Way2Drug + SwissPredict) и определения наиболее перспективной модели *in vitro* для изучения действия исследуемых молекул на наибольшее количество вероятных мишеней для последующего фармакологического скрининга.

4. Результаты скрининга потенциальной фармакологической активности выделенных индивидуальных веществ *in silico* (SwissPredict), анализа вероятных сочетанных эффектов на большинство мишеней в исследуемых метаболических путях и прогностического определения целевой группы перспективных лекарственных кандидатов.

5. Результаты скрининга фармакологической активности выделенных индивидуальных веществ и суммарных экстрактов на моделях системы гемостаза организма человека *in vitro*; целевая группа перспективных лекарственных кандидатов-лидеров.

6. Результаты изучения взаимного влияния лекарственных кандидатов-лидеров при эквимольном смешении на фармакологическую активность на моделях системы гемостаза организма человека *in vitro*.

7. Основные принципы и базовый алгоритм предлагаемой методологии поиска потенциальных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов обусловлена соответствием используемых научных методов исследования поставленным задачам, применением современного оборудования и высокотехнологичных методов исследования, воспроизводимостью полученных результатов и применением корректных методов статистической обработки данных.

Основные положения работы были доложены на Международных конгрессах «РНУТОРНАРМ» (Санкт-Петербург, 2016, 2019, 2023; Грац (Австрия), 2017; Хорген (Швейцария), 2018); XXII Санкт-Петербургской Ассамблее молодых ученых и специалистов (Санкт-Петербург, 2017); Международных научно-методических конференциях «Гаммермановские чтения» (Санкт-Петербург, 2017, 2019; Пермь, 2023); Международной научной конференции «Перспективы лекарственного растениеводства» (Москва, 2018); Международных научно-практических конференциях «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (Пятигорск, 2019, 2023); XVII Международной школе-конференции "Magnetic Resonance and its Applications Proceedings - SPINUS 2020» (Санкт-Петербург, 2020); Научно-практической конференции с международным участием «Создание новых лекарств – от идеи до производства» (Пермь, 2021); Научно-практических конференциях «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности» (Москва, 2021, 2023); Международных научно-практических конференциях «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2021, 2023); Международной научной конференции «От биохимии растений – к биохимии человека» (Москва, 2022); Международной научно-практической конференции «Фармацевтическая наука XXI века: актуальные проблемы и перспективы их решений» (Уфа, 2022); Научно-методических конференциях с международным участием «Сандеровские чтения» (Санкт-Петербург, 2023, 2024); Конгрессе «Химико-фармацевтические и биологические препараты: фармацевтическая и клиническая разработка согласно правилам ЕАЭС» (Москва, 2023); Международной научной

конференции «Интеграционные связи фармацевтической экологии в современных реалиях» (Москва, 2023).

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 36 научных работ, в том числе 13 статей в журналах, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованный ВАК Минобрнауки России, а также 5 статей, индексируемых в наукометрической базе данных Scopus. Получены 4 патента Российской Федерации на изобретение и свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Связь задач исследования с планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Минздрава России, в том числе в рамках тематики государственного задания «Разработка методологической концепции контроля качества лекарственных средств и субстанций природного происхождения с использованием инновационных аналитических методов» (регистрационный номер АААА-А20-120121790032-2 от 17.12.2020).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения работы соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 1 – Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ; пункту 6 – Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов. Работа представляет собой самостоятельный научный труд автора и включает исследования за период с 2013 по 2024 г. Во всех работах, выполненных в соавторстве, вклад автора выражается участием в сборе и определении сырья, выполнении работ по выделению и идентификации индивидуальных соединений, проведении скрининговых исследований фармакологической активности, обобщении и систематизации полученных результатов, формулировке основного алгоритма и принципов предлагаемой методологии, а также руководстве междисциплинарной научной группой исследователей.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 388 страницах машинописного текста, состоит из введения, 6 глав (обзор литературы; объекты и методы исследований; 3 главы, содержащие результаты экспериментальных исследований; базовый алгоритм и принципы разработанной методологии), заключения, 2 приложений, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 29 рисунками и 45 таблицами. Список литературы включает 216 источников, из них 45 на русском языке и 171 – на иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ: ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ КАНДИДАТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ: СКРИНИНГ, ВЫДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ И ИХ ИССЛЕДОВАНИЕ

Лекарственные растения являются уникальными источниками биологически активных соединений, представляют фундаментальный и практический интерес ученых и практиков разных областей. В мировой флоре существует множество недостаточно изученных растений, которые могут быть использованы для получения высокоэффективных и безопасных лекарственных препаратов на основе индивидуальных веществ, составляющих современные базы данных.

Литературные данные об исследованиях *in silico* растительных препаратов на основе индивидуальных веществ показывают, что биологически активными веществами с наиболее широким спектром действия являются фенольные соединения, главным образом – флавоноиды, изофлавоноиды, халконы, антоцианы. Таким образом, сформулированы основные критерии выбора наиболее репрезентативных модельных объектов исследования для разработки заявленной методологии: а) преобладающей химической группой веществ в объектах исследования являются фенольные соединения; б) изучаемые растения относятся к различным таксономическим группам (семействам); в) изучаемые растения являются преимущественно дикорастущими, должны иметь обеспеченную сырьевую базу и потенциал к культивированию; г) в качестве материала для исследования рационально использовать надземные части растений как наиболее легко воспроизводимые источники основных вторичных метаболитов. В результате, в качестве объектов исследования выбраны надземные части *Empetrum nigrum*, *Iris lactea*, *Ononis arvensis*, *Solidago canadensis* и листья *Rubus chamaemorus*. Все указанные растения обладают высоким антиоксидантным потенциалом, который может быть использован для создания лекарственных средств, предназначенных для терапии патологических состояний, в звене патогенеза которых лежит оксидативный стресс (нейродегенеративные заболевания, гипоксические состояния различной этиологии, сосудистые и иммунные нарушения, дегенеративные изменения гепатобилиарной системы, онкологические заболевания и др.).

Для экстракции, очистки, фракционирования, выделения индивидуальных соединений и их идентификации используют как традиционные методы, так и современные. При выборе методов исследователям необходимо учитывать природу разделяемых веществ, полноту экстракции, универсальность, простоту метода, возможность работы с малыми количествами сырья/веществ, экспрессность, экономичность, точность, возможность использования в качественном и количественном анализе. В наибольшей степени данным критериям соответствуют колоночная хроматография, ВЭЖХ, ГХ, МС, ЯМР-спектроскопия, позволяющие при минимальных

количествах исходного сырья и получаемых очищенных индивидуальных веществ проводить их идентификацию, и в дальнейшем подвергать фармакологическому скринингу как современными методами *in silico*, так и традиционными методами *in vitro*, которые в данном случае являются более релевантными и воспроизводимыми по сравнению с методами *in vivo*.

В распоряжении исследователей находятся несколько платформ для проведения *in silico* исследований, каждая из которых в отдельности обладает рядом недостатков, одним из которых является невозможность применения для прогнозирования сочетанной биологической активности нескольких соединений. Решением этой проблемы может быть интеграция нескольких баз наиболее проработанных сервисов, например, Way2Drug и SwissPredict, которые позволяют определить возможные направления поиска сочетанных эффектов веществ и уменьшить объем экспериментальных исследований *in vitro*, *in vivo*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения суммарных экстрактов и выделения индивидуальных соединений использовали растительное сырье, указанное в Таблице 1.

Таблица 1 – Виды заготавливаемого сырья, места и сроки его заготовки

Объект исследования	Вид сырья	Фаза вегетации	Место сбора	Год сбора	Метод сушки сырья
<i>Empetrum nigrum</i> L. (<i>Ericaceae</i>)	Побеги	Цветение	Окрестности питомника лек. растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км)	2019	Воздушно-теневая сушка
<i>Rubus chamaemorus</i> L. (<i>Rosaceae</i>)	Листья	Плодоношение	Окрестности питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России	2019	Инфракрасная сушка
<i>Iris lactea</i> Pall. (<i>Iridaceae</i>)	Трава	Цветение	Окрестности озера Гусиное (Республика Бурятия); окрестности питомника лек. растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России	2008, 2019	Воздушно-теневая сушка
<i>Ononis arvensis</i> L. (<i>Fabaceae</i>)	Трава	Цветение	Берег реки Великая, окрестности г. Остров, Псковская область; окрестности питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России	2012, 2019	Воздушно-теневая сушка
<i>Solidago canadensis</i> L. (<i>Asteraceae</i>)	Трава	Цветение	Окрестности питомника лекарственных растений ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России	2016, 2019	Воздушно-теневая сушка

Экстракты из растительного сырья получали методом исчерпывающей мацерации. Фракционирование экстрактов осуществляли с помощью жидкость-жидкостной экстракции органическими растворителями. Контроль за полнотой мацерации и жидкость-жидкостной экстракции осуществляли путем взвешивания сухого остатка, оставшегося после испарения аликвоты экстракта или фракции. Экстракты и фракции концентрировали на вакуумно-ротационном испарителе Hei-VAP Precision (Heidolph, Германия).

Выделение индивидуальных соединений из фракций осуществляли с использованием методов открытой колоночной хроматографии на сорбентах с различной селективностью – обращенно-фазового сорбента на основе стирол-дивинилбензола – Dianion HP-20 производства компании Sigma-Aldrich (США), сорбента для эксклюзионной хроматографии – Sephadex LH-20 производства компании Cytiva Sweden AB (Швеция) и нормально-фазового сорбента – Silica gel Davisil Grade 635 производства компании Sigma-Aldrich (США).

Контроль за эффективностью разделения веществ на открытых колонках и выбор целевых фракций для последующего препаративного выделения индивидуальных соединений осуществлялся на основании результатов тонкослойной хроматографии и высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) в системах гексан:дихлорметан:метанол (2 : 2 : 0,5) и н-бутанол : уксусная кислота : вода (4 : 1 : 2), с детектированием веществ в ультрафиолетовом свете при длинах волн 254 и 365 нм, а также аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ), которая осуществлялась на приборе Prominence (Shimadzu, Япония) серии LC-20, оснащенный автосамплером SIL-20A, термостатом СТО-20АС и диодно-матричным детектором SPD-M20A. Для анализов использовалась обращенно-фазовая колонка SUPELCOSIL LC-18 (250 × 4,6 мм, 5 мкм).

Полученные после колоночной хроматографии целевые фракции подвергались препаративной ВЭЖХ на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенным препаративным насосом P-1800, программируемым спектрофотометрическим детектором UV Detector 2520 и препаративной колонкой Kromasil (250 × 30,5 мкм). Ввод проб осуществляли вручную с использованием плунжерного шприца вместимостью 2 мл (Hamilton, США). Объем вводимой пробы 0,2–0,5 мл.

Ультрафиолетовые спектры соединений записывали в смеси ацетонитрил-вода в различных соотношениях на приборе СФ-2000, производства ОКБ «Спектр» (Россия).

Структуру выделенных индивидуальных соединений устанавливали с помощью методов: ЯМР-спектроскопии на приборе Bruker Avance III 400 NMR Spectrometer, производства компании Bruker (США). Запись спектров производили при температуре 25° С с использованием дейтерированного диметилсульфоксида в качестве растворителя при частоте 400 МГц, расшифровку полученных спектров проводили с использованием программного обеспечения MestReNova 14.1.2; масс-спектрометрии высокого разрешения на приборе Bruker Micromass Q-TOF spectrometer, производства компании Bruker (США).

Компьютерный прогноз фармакологической активности исследуемых молекул осуществляли при помощи сервисов Way2Drug и SwissPredict.

Исследования по оценке влияния на систему гемостаза индивидуальных веществ и экстрактов в условиях *in vitro* выполнены на крови 57 здоровых доноров-мужчин в возрасте 18–24 лет. Забор крови проводился из кубитальной вены с использованием систем вакуумного забора крови BD Vacutainer (Becton Dickinson and Company США). В качестве стабилизатора венозной крови использовался 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9 : 1. Все тесты проводили на обогащенной и обедненной тромбоцитами плазмах. Образцы богатой тромбоцитами плазмы получали центрифугированием цитратной крови при 1000 об/мин в течение 10 мин, бестромбоцитарной плазмы – при 3000 об/мин в течение 20 мин. В работе использовали центрифугу ОПН-3.02 (ОАО ТНК «ДАСТАН», Кыргызстан).

Оценка влияния на систему гемостаза выделенных соединений, экстрактов и препаратов сравнения проводилось в стандартной концентрации 1,0 мг/мл.

Исследование влияния на агрегацию тромбоцитов проводили по методу Born (Born G. V. R., 1962) на агрегометре «АТ-02» (НПФ «Медтех», Россия). В качестве индукторов агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 мкг/мл и коллаген в концентрации 5 мг/мл производства фирмы «Технология-Стандарт» (г. Барнаул).

Определение антикоагуляционной активности проводили общепризнанными клоттинговыми тестами на турбидиметрическом гемокоагулометре Solar CGL 2110 (ЗАО «СОЛАР», Россия). Определяли показатели активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), протромбинового времени и концентрации фибриногена по A. Clauss (Козлов А. А. и др., 2009). В работе использовали реактивы производства фирмы «Технология-Стандарт» (г. Барнаул).

В качестве маркера активации тромбоцитов измеряли экспрессию Р- селектина на поверхности тромбоцитов. Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II (США), используя оригинальное программное обеспечение. Измеряли связывание с тромбоцитами крови здоровых доноров флюорисцентно-меченых антител против CD62. Для этого образцы богатой тромбоцитами плазмы разводили 100-кратно 0,15 М фосфатно-солевым буферным раствором (Рн 7,0–7,5), вносили исследуемые препараты и инкубировали в течение 5 мин. Для активации тромбоцитов в пробы вносили АДФ до конечной концентрации 20 мкг/мл и перемешивали. Активацию проводили в течение 15 мин, после чего клетки фиксировали добавлением 1 %-ГО раствора формалина. После инкубации образцы богатой тромбоцитами плазмы окрашивали 20 мин при комнатной температуре мышиными моноклональными антителами CD62, мечеными APC (алофикоцианином) (Becton Dickinson, США) согласно рекомендациям производителя. Параметры настройки прибора были одинаковы для всех измерений. Для каждой пробы собирали не менее 10 тыс. событий. «Тромбоцитарное окно» выделяли по параметрам прямого (FCS) и малоугольного (SSC) светорассеяний в логарифмической шкале координат. Оценивали количество позитивных клеток (%) по CD62.

В качестве препарата сравнения на этапе скрининга в отношении влияния на агрегацию тромбоцитов, была выбрана ацетилсалициловая кислота (Фармацевтическая фабрика «Шандонг Ксинхуа Фармасьютикал Ко., ЛТД», Китай) в концентрации 10^{-3} М/л. В качестве позитивного контроля при оценке экспрессии Р-селектина использовали пентоксифиллин (ОАО «Дальхимфарм», Россия) в концентрации 10^{-3} М/л, в качестве антикоагулянта – гепарин натрия (ОАО «Синтез», Россия) в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ г/мл.

Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета Statistica 10.0 (StatSoft Inc, США). Проверку на нормальность распределения фактических данных выполняли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Выявлено, что вид распределения полученных данных отличается от нормального, поэтому при дальнейшей работе использовались непараметрические методы. Данные представлены в виде медианы Me , 25-го и 75-го процентилей. Дисперсионный анализ проводили с помощью критерия Краскела–Уоллиса. Критический уровень значимости p для статистических критериев принимали равным 0,05.

ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ *EMPETRUM NIGRUM L.*, *RUBUS CHAMAEMORUS L.*, *IRIS LACTEA PALL.*, *ONONIS ARVENSIS L.*, *SOLIDAGO CANADENSIS L.*

Суммарные экстракты растений представляют собой сложные смеси первичных и вторичных метаболитов, принадлежащих к различным химическим классам. Для решения задачи настоящего диссертационного исследования по выделению индивидуальных соединений из растительного сырья экспериментальным путем, была разработана универсальная методика, применимая к любому растительному объекту и позволяющая оптимизировать эффективность и скорость выделения индивидуальных веществ.

Первичным этапом выделения индивидуальных соединений является наработка достаточного количества суммарного растительного экстракта путём использования многократной экстракции 96 %-м или 80 %-м этанолом (мацерация измельчённого растительного сырья). После настаивания и насыщения экстрагента веществами экстракт фильтруется и упаривается до густой консистенции на ротационном испарителе. Получаемый при этом отгон, представляющий собой 96 %-й или 80 %-й этанол, вновь используется для продолжения экстракции сырья. Данный процесс повторяется многократно до истощения сырья. Описанная особенность методики позволяет получить максимально концентрированный суммарный экстракт с исчерпывающим извлечением преимущественно вторичных метаболитов из растительного сырья. Применение 96 %-го этанола в качестве экстрагента позволяет выделять из сырья широкий спектр веществ, обладающих различной полярностью. Применение спирта меньших концентраций является нецелесообразным из-за получения на каждой стадии отгонки азеотропной смеси спирт–вода, имеющей различную концентрацию спирта, при увеличении разницы

концентраций от стадии к стадии, что не позволило бы добиться унификации экстракции от стадии к стадии.

После наработки суммарного экстракта, представляющего смесь различных метаболитов, проводится его последовательное фракционирование с помощью жидкость-жидкостной экстракции, используя ряд экстрагентов с возрастающей полярностью: н-гексан, дихлорметан и н-бутанол. После первой стадии жидкость-жидкостной экстракции полученные органические фракции отделяются и концентрируются для регенерации растворителя, который затем повторно применяется для жидкость-жидкостной экстракции. Данная методика позволяет максимально полно извлечь целевые компоненты в соответствующие растворители и значительно сэкономить расход растворителя-экстрагента.

Фракции, полученные с помощью экстракции органическими растворителями, а также водный остаток далее разделяются методом последовательной препаративной колоночной хроматографии с применением сорбентов с различной селективностью, что позволяет максимально полно разделить соединения друг от друга за счет различных механизмов сорбции веществ. Подробная универсальная схема выделения фенольных соединений представлена на Рисунке 1.

Полученные после колоночной хроматографии подфракции анализируются методом ВЭЖХ, после чего определяется перечень целевых подфракций, содержащих 2–3 индивидуальных соединения и пригодных для последующей наработки таких индивидуальных веществ методом препаративной ВЭЖХ. Контроль полноты и качества выделения индивидуальных соединений осуществляется также методом аналитической ВЭЖХ. Выделенные индивидуальные соединения лиофильно высушиваются, а затем анализируются методами масс-спектрометрии высокого разрешения для определения брутто-формулы и ЯМР-спектроскопии для установления самой структуры.

В рамках диссертационного исследования проведено подробное исследование фенольных соединений, содержащихся в надземной части *Empetrum nigrum*, *Iris lactea*, *Ononis arvensis*, *Solidago canadensis* и листьях *Rubus chamaemorus*. В результате выделены и структурно идентифицированы 38 индивидуальных соединений, 8 из которых являются новыми природными. Масса выделенных веществ составила от 1,6 до 38,0 мг.

Для всех выделенных индивидуальных веществ разработаны паспорта субстанций, содержащие шифр, химическое название, структурную формулу, ВЭЖХ-, УФ-, ЯМР- и масс-спектры, информацию о научно-практической новизне и иных характеристиках. Из паспортов субстанций сформирован реестр индивидуальных веществ фенольной природы, представленный в Приложении 1 к настоящей диссертационной работе.

Из надземной части *Empetrum nigrum* выделены 1 производное флавоноидов, 3 таннина, 3 производных бибензила (из них новое природное соединение – **1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-фенил этан**), 4 производных 9,10-дигидрофенантрена (из них новое природное соединение – **6-гидрокси-2,3,4-триметокси-9,10-дигидрофенантрен**), 4 производных дигидрохалконов (из них 1 новое природное

соединение – 2', 4'-диметокси дигидрохалкон), 2 производных халкона. Из листьев *Rubus chamaemorus* выделены 3 производных гликозидов глюконовых кислот, 2 таннина (из них 1 новое природное соединение – 4-O- α -L-арабинофуранозилэллаговая кислота). Из надземной части *Iris lactea* выделены 8 производных С-гликозидов флавоноидов (из них 4 новых природных соединения – 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлавоон – 8 - С - (2'' - О - а - L - рамнопиранозил) - b – D - глюкопиранозид (изоэмбинин); 4'''-ацетилэмбинин; 2''' ,4''' - диацетилэмбинин; 6'' ,4''' - диацетилэмбинин;), 1 производное ксантона. Из надземной части *Ononis arvensis* выделены 1 производное флавоноидов и 2 производных изофлавоноидов. Из надземной части *Solidago canadensis* выделены 4 производных флавоноидов. Подробная информация о всех выделенных и изученных в рамках настоящего диссертационного исследования индивидуальных веществах представлена в Таблице 2.

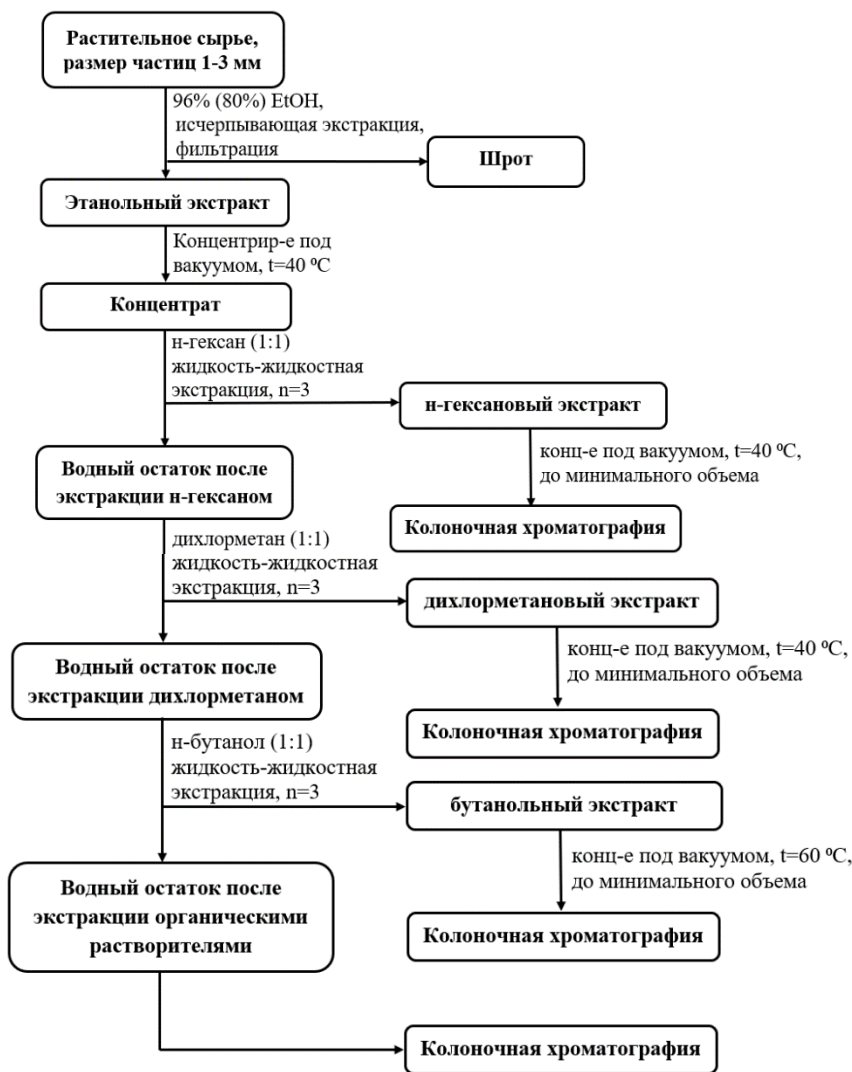
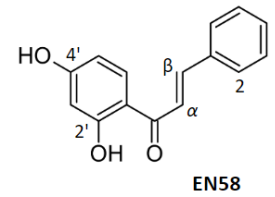
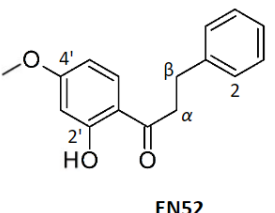
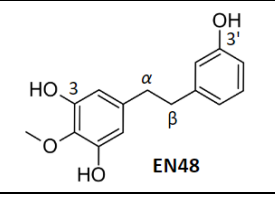
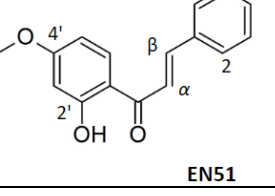
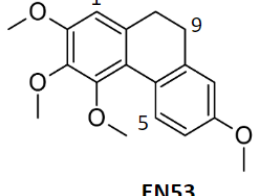


Рисунок 1 – Универсальная схема выделения фенольных соединений

Таблица 2 – Индивидуальные соединения, выделенные и изученные в рамках диссертационного исследования

Сырьё	Шифр	Химическая группа	Масса, мг	Новизна	Химическое название	Структурная формула
Побеги <i>Empetrum nigrum</i>	EN15	Производное бибензила	30,0	Ранее известное для растения	1-(3-гидроксифенил)-2-(3-гидрокси-4,5-диметоксифенил) этан	
	EN17	Производное 9,10-дигидрофенантрена	20,0	Ранее неизвестное для растения	4,7-дигидрокси-2,3-диметокси-9,10-дигидрофенантрен	
	EN19	Производное бибензила	20,0	Новое природное соединение	1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-фенилэтан	
	EN20	Производное 9,10-дигидрофенантрена	15,0	Новое природное соединение	6-гидрокси-2,3,4-триметокси-9,10-дигидрофенантрен	
	EN23	Производное дигидрохалконов	30,6	Ранее известное для растения	4'-гидрокси-2'-метоксидигидрохалкон (метилэмпетрон)	

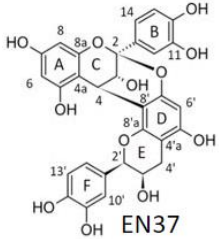
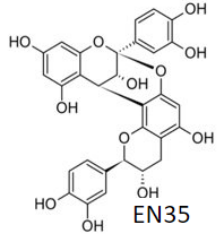
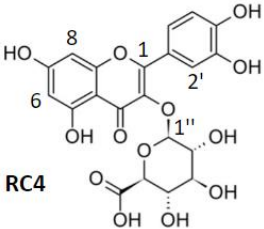
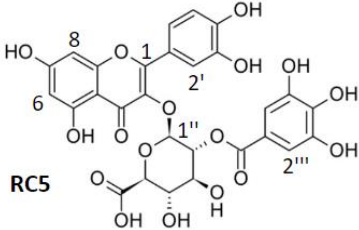
Продолжение Таблицы 2

Сырьё	Шифр	Химическая группа	Масса, мг	Новизна	Химическое название	Структурная формула
Побеги <i>Empetrum nigrum</i>	EN58	Производное халконов	38,0	Ранее известное для растения	2',4'-дигидроксихалкон	 EN58
	EN52	Производное дигидрохалконов	5,0	Ранее известное для растения	2'-гидрокси-4'-метоксидигидрохалкон	 EN52
	EN48	Производное бибензила	15,0	Ранее известное для растения	1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-(3-гидроксифенил)этан	 EN48
	EN51	Производное халконов	10,0	Ранее известное для растения	2'-гидрокси-4'-метоксихалкон	 EN51
	EN53	Производное 9,10-дигидрофенантрена	8,0	Ранее известное для растения	2,3,4,7-тетраметокси-9,10-дигидрофенантрен	 EN53

Продолжение Таблицы 2

Сырьё	Шифр	Химическая группа	Масса, мг	Новизна	Химическое название	Структурная формула
Побеги <i>Empetrum nigrum</i>	EN54	Производное дигидрохалконов	4,0	Новое природное соединение	2',4'-диметокси-дигидрохалкон	 EN54
	EN55	Производное 9,10-дигидрофенантрена	10,0	Ранее известное для растения	5-гидрокси-2,3,4-триметокси-9,10-дигидрофенантрен	 EN55
	EN56	Производное флавоноидов	6,0	Ранее известное для растения	5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванон	 EN56
	EN59	Производное дигидрохалконов	30,0	Ранее известное для растения	2',4'-дигидроксидигидрохалкон (эмпетрон)	 EN59
	EN39	Конденсированные танины	1,6	Ранее неизвестное для растения	эпикатехин-(2β→O→5, 4β→6)-эпикатехин	 EN39

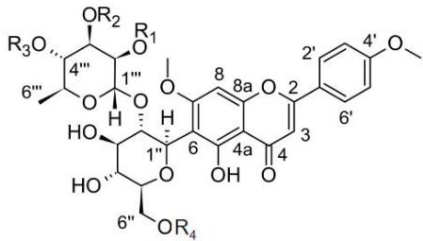
Продолжение Таблицы 2

Сырьё	Шифр	Химическая группа	Масса, мг	Новизна	Химическое название	Структурная формула
Побеги <i>Empetrum nigrum</i>	EN37	Конденсированные танины	24,7	Ранее неизвестное для растения	эпикатехин- (2 β →O→7,4 β →8) - эпикатехин (процианидин А2)	 EN37
	EN35	Конденсированные танины	3,6	Ранее неизвестное для растения	эпикатехин- (2 β →O→7,4 β →8)- катехин (процианидин А1)	 EN35
Листья <i>Rubus chamaemorus</i>	RC4	Производное гликозидов глюкуроновых кислот	2,3	Ранее известное для растения	кверцетин-3-О- β -D- глюкуронид (миквелианин)	 RC4
	RC5	Производное гликозидов глюкуроновых кислот	11,0	Ранее неизвестное для растения	кверцетин-3-О- β -D-2''- галлоилглюкуронид	 RC5

Продолжение Таблицы 2

Сырьё	Шифр	Химическая группа	Масса, мг	Новизна	Химическое название	Структурная формула
Листья <i>Rubus chamaemorus</i>	RC6	Таннины	3,6	Ранее известное для растения	(+)-эпикатехин	
	RC7	Производное гликозидов глюконовых кислот	8,0	Ранее известное для растения	кемпферол-3-О-β-D-глюкуронид	
	RC14	Таннины	2,0	Новое природное соединение	4-О-α-L-арабинофуранозил-эллаговая кислота	
Трава <i>Iris lactea</i>	IL2	Производное ксантона	3,0	Ранее известное для растения	2-(β-D-глюкопиранозил) - 1,3,6,7-тетрагидрокси-9Н-ксантен-9-он (мангиферин)	
	IL3	C-гликозид флавоноидов	3,0	Ранее неизвестное для растения	апигенин-8-C-β-D-глюкопиранозил-4'-О-β-D-глюкопиранозид	

Продолжение Таблицы 2

Сырьё	Шифр	Химическая группа	Масса, мг	Новизна	Химическое название	Структурная формула																																			
Трава <i>Iris lactea</i>	IL10	С-гликозид флавоноидов	4,0	Новое природное соединение	4 ^{'''} -ацетилэмбинин	 <table border="0"> <tr> <td>R1</td> <td>R2</td> <td>R3</td> <td>R4</td> <td></td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>H</td> <td>Ac</td> <td>H</td> <td>IL10</td> </tr> <tr> <td>Ac</td> <td>H</td> <td>Ac</td> <td>H</td> <td>IL11</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>H</td> <td>Ac</td> <td>Ac</td> <td>IL12</td> </tr> <tr> <td>Ac</td> <td>Ac</td> <td>Ac</td> <td>H</td> <td>IL21</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>Ac</td> <td>Ac</td> <td>H</td> <td>IL22</td> </tr> <tr> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>IL23</td> </tr> </table>	R1	R2	R3	R4		H	H	Ac	H	IL10	Ac	H	Ac	H	IL11	H	H	Ac	Ac	IL12	Ac	Ac	Ac	H	IL21	H	Ac	Ac	H	IL22	H	H	H	H	IL23
	R1	R2	R3	R4																																					
	H	H	Ac	H	IL10																																				
	Ac	H	Ac	H	IL11																																				
	H	H	Ac	Ac	IL12																																				
	Ac	Ac	Ac	H	IL21																																				
H	Ac	Ac	H	IL22																																					
H	H	H	H	IL23																																					
IL11	С-гликозид флавоноидов	6,0	Новое природное соединение	2 ^{'''} ,4 ^{'''} -диацетилэмбинин																																					
IL12	С-гликозид флавоноидов	3,0	Новое природное соединение	6 ^{'''} ,4 ^{'''} -диацетилэмбинин																																					
IL21	С-гликозид флавоноидов	5,0	Ранее известное для растения	2 ^{'''} ,3 ^{'''} - диацетилэмбинин																																					
IL22	С-гликозид флавоноидов	5,0	Ранее неизвестное для растения	3 ^{'''} ,4 ^{'''} -диацетилэмбинин																																					
IL23	С-гликозид флавоноидов	3,0	Ранее известное для растения	6-(2-О-(α-L-рамнопиранозил)-β-D-глюкопиранозил)-5-гидрокси-7-метокси-2-(4-метоксифенил)-4H-1-бензопиран-4-он (Эмбинин)																																					

Продолжение Таблицы 2

Сырьё	Шифр	Химическая группа	Масса, мг	Новизна	Химическое название	Структурная формула
Трава <i>Iris lactea</i>	IL9	С-гликозид флавоноидов	3,0	Новое природное соединение	5-гидрокси-7,4'-диметоксифлавон-8-С-(2''-О-α-L-рамнопиранозил)-β-D-глюкопиранозид (изоэмбинин)	
Трава <i>Ononis arvensis</i>	OA1	Производное изофлавоноидов	5,1	Ранее известное для растения	псевдобаптигенин-7-О-β-D-глюкопиранозид	
	OA2	Производное изофлавоноидов	6,9	Ранее известное для растения	формонетин-7-О-β-D-глюкопиранозид	
	OA6	Производное флавоноидов	2,0	Ранее неизвестное для растения	кемпферол-3-О-β-D-глюкопиранозид (астрагалин)	

Продолжение Таблицы 2

Сырьё	Шифр	Химическая группа	Масса, мг	Новизна	Химическое название	Структурная формула
Трава <i>Solidago canadensis</i>	SC1	Производное флавоноидов	3,3	Ранее известное для растения	3,3',4',5,7 - пентагидроксифлавоон (кверцетин)	 SC1
	SC2	Производное флавоноидов	8,2	Ранее известное для растения	кверцетин-3-О-β-D-6''-ацетилглюкопиранозид	 SC2
	SC3	Производное флавоноидов	6,9	Ранее известное для растения	кверцетин-3-О-рутинозид (рутин)	 SC3
	SC10	Производное флавоноидов	3,0	Ранее известное для растения	изорамнетин-3-О-β-D-рутинозид (нарциссин)	 SC10

ГЛАВА 4. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗМОЖНЫХ МЕХАНИЗМОВ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ *IN SILICO* ВЫДЕЛЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Современные численные методы, применяемые для поиска перспективных лекарственных кандидатов, имеют очень большой потенциал, однако существенно ограничены необходимостью построения верифицированных моделей, адекватно имитирующих метаболические процессы организма. Традиционно молекулярный докинг считается основным и зачастую единственным методом численных исследований при поиске новых лекарственных средств. В рамках данного диссертационного исследования существенно дополнен арсенал инструментов для проведения исследований *in silico* и предложен новый подход, основанный на методологии прогнозирования биологической активности с использованием синтетической модели, включающей три компонента:

- 1) анализ и обобщение результата систем прогнозирования биологической активности химических соединений на основе методов искусственного интеллекта и обработки больших данных;
- 2) молекулярный докинг и моделирование взаимодействия рецептор-лиганд на уровне молекулярной динамики;
- 3) имитационные модели метаболических путей, позволяющие численно исследовать реакции биологических подсистем на различных уровнях.

Систематическое применение предложенного подхода позволяет прогнозировать биологические эффекты при одновременном воздействии нескольких химических соединений в разработке лекарственных средств сложного состава.

В результате прогнозирования возможных видов биологической активности для молекул всех выделенных в рамках диссертационной работы индивидуальных соединений с помощью компьютерной программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances, версия 2020 Refined), было выявлено 1945 возможных фармакологических эффектов и механизмов действия со средней точностью 97 % (Filimonov D. A. et al., 2018). Распределение количества ожидаемых биологических эффектов по группам выделенных соединений приведено на Рисунке 2. Очевидно, что группа соединений EN доминирует как в абсолютном выражении, так и по количеству активностей на одно соединение (в среднем 520 эффектов на одно соединение).

Построение онтологии биологических эффектов химических соединений, являющихся кандидатами в лекарственные средства, целесообразно проводить с использованием общедоступных рецензируемых баз данных, таких как Way2Drug и Swiss Predict. Выбор именно этих инструментов для начальной стадии поисковых исследований новых лекарственных средств обусловлен несколькими факторами, среди которых – полнота и достоверность содержащейся информации, а также высокоэффективные алгоритмы прогнозирования биологических эффектов. Наиболее устойчивые и воспроизводимые кластеризации были получены для соединений, выделенных из *Empetrum nigrum*, поэтому этой группе было уделено наибольшее внимание.

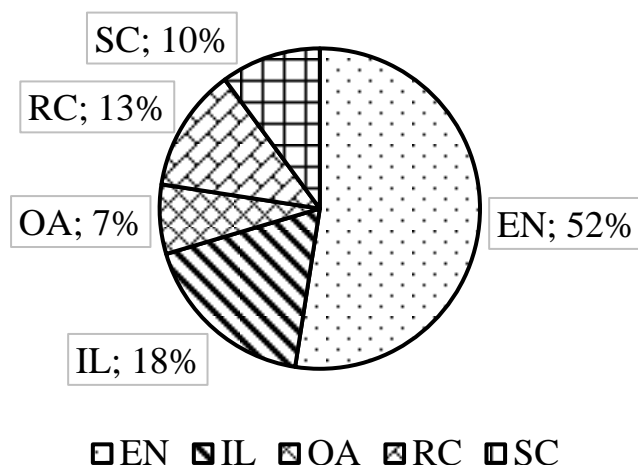


Рисунок 2 – Количество прогнозируемых видов активности по группам соединений

Первый шаг построения онтологии биологических эффектов состоит в составлении как можно более полного перечня возможных видов влияния лекарственных кандидатов на известные биохимические процессы и метаболические пути с последующим сокращением списка за счет ранжирования по принципу наибольшей вероятности обнаружения и подтверждения прогнозируемого эффекта. Обычно ранжированные списки ожидаемых биологических эффектов, генерируемых каждой системой прогнозирования, содержат несколько сотен практически равнозначных видов активности. Для примера в Таблице 3 приведены первые 10 строк из ранжированного списка по количеству соединений с ожидаемым видом биологической активности, прогнозируемой системой Way2Drug, для веществ, выделенных из *Empetrum nigrum*.

Таблица 3 – Прогнозируемые системой Way2Drug биологические эффекты химических соединений природного происхождения, выделенных из *Empetrum nigrum*

Количество соединений	Активность
17	Membrane integrity agonist
17	Estrogen-related receptor alpha agonist
15	Fibrinolytic
14	Chlordecone reductase inhibitor
13	Antineurotoxic
12	Penicillin-binding protein ampH inhibitor
11	Antiseborrheic
11	HSPB1 expression inhibitor
11	Feruloyl esterase inhibitor
9	3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase inhibitor

Вторым инструментом, использованным для прогнозирования возможных мишеней для исследуемых соединений, была система SwissPredict. Поскольку принципы работы прогностических систем Way2Drug и SwissPredict значительно отличаются, формат выдачи и прогнозируемые виды биологической активности существенно различны. Тем не менее, пересечения между прогнозируемыми разными системами видами активности вполне наблюдаемы. В Таблице 4 приведен пример выдачи результатов прогнозирования для соединения EN54. SwissPredict предполагает возможной мишенью эстроген-связанный альфа-рецептор, который также может являться, по результатам прогноза Way2Drug, мишенью еще для 16 других соединений, содержащихся в *Empetrum nigrum*. К сожалению, такие прямые совпадения относятся скорее к исключениям, в большинстве случаев требуется более глубокий анализ возможных мишеней с учетом возможности взаимодействия на разных уровнях биохимических систем и метаболических путей. В качестве иллюстрации можно отметить, что SwissPredict не исключает тромбин и X фактор свертывания крови из числа потенциальных мишеней для соединения EN54, в то время как Way2Drug предполагает, что большинство изучаемых соединений могут обладать фибринолитической активностью.

Таблица 4 – Возможные мишени и вероятности взаимодействия для химического соединения EN54, вычисленные сервисом SwissPredict

Вещество	Активность	Вероятность
EN54	Acetylcholinesterase	0,14
EN54	Estrogen receptor alpha	0,12
EN54	Cytochrome P450 19A1	0,10
EN54	Monoamine oxidase B	0,10
EN54	Sigma opioid receptor	0,10
EN54	ATP-binding cassette sub-family G member 2	0,10
EN54	Thrombin and coagulation factor X	0,10
EN54	Protein kinase C gamma (by homology)	0,10

Из побегов *Empetrum nigrum* всего было выделено 17 соединений, и все они, по данным прогноза Way2Drug, могут способствовать сохранению целостности клеточных мембран, однако проведенный анализ доступных литературных источников показал, что до настоящего времени не опубликованы данные о том, что соединения *Empetrum nigrum* обладают такой активностью, несмотря на более чем столетнюю историю изучения этого растения. Как следствие, неизвестны возможные метаболические пути и вероятные мишени для действия компонентов, выделенных из этого вида растений.

Второй вид биологической активности, который тоже отмечен у всех исследованных соединений, это агонист альфа эстроген-связанного рецептора. Этот рецептор относится к орфаным, не имеющим эндогенных лигандов, но при этом играет

важнейшую роль в регуляции метаболизма. Активность эстроген-связанного рецептора регулируется, преимущественно, белками-корегуляторами, приводя к связыванию этого рецептора с определенным фрагментом ДНК. Как следствие, данный вид активности, если и проявляется, то в значительной степени опосредованно через длинную цепочку метаболических реакций, что делает практически невозможным прямое доказательство влияния этих соединений именно на эстроген-связанный рецептор. Результаты молекулярного докинга показали, что большинство исследованных соединений, выделенных из *Empetrum nigrum*, обладают высокой аффинностью к центру связывания лиганда этого рецептора (от минус 6 до минус 8 kcal/mol), однако экспериментальное подтверждение этого факта на биологических моделях невозможно по двум причинам:

1) для данного рецептора нет однозначно определенного влияния на метаболические пути и/или биохимические превращения;

2) для исследования этого рецептора нет валидированных биологических экспериментальных моделей.

Третий по частоте встречаемости эффект – фибринолитический. Свертывающая система крови млекопитающих изучена достаточно хорошо, метаболические пути известны и представлены в виде структурных схем, созданы математические модели, с высокой степенью точности воспроизводящие экспериментально измеряемые параметры (например, динамика изменения концентрации фибриногена в плазме в процессе реализации каскада реакций системы свертывания). Проведённый молекулярный докинг показал, что соединения, выделенные из *Empetrum nigrum*, потенциально могут взаимодействовать с теми же мишенями, что и уже известные антикоагулянты.

Вторичные эффекты антикоагулянтов хорошо известны, и включают такие механизмы, как вазо- и кардиопротекция, коронарная вазодилатация (за счет взаимодействия с растворимой гуанилатциклазой). Эти потенциальные биологические эффекты вероятны у всех соединений, включенных в исследование.

Таким образом, по результатам предварительного анализа и обобщения результатов прогнозирования Way2Drug и SwissPredict возможных видов биологической активности можно сделать вывод о том, что наиболее перспективной системой организма человека для изучения действия исследуемых молекул на наибольшее количество вероятных мишеней для последующего фармакологического скриннга методами *in vitro* является **система гемостаза**, а перспективным направлением может являться разработка новых препаратов противосвертывающего и антиагрегирующего действия на основе фенольных соединений растительного происхождения.

На основе предварительного анализа *in silico* было установлено, что молекулы выделенных в рамках диссертационной работы индивидуальных соединений могут обладать противосвертывающей активностью, однако детализированные данные о возможных молекулярных мишенях и механизмах реализации этой активности отсутствуют. Анализ публикаций по этой тематике позволяет предположить, что

антикоагулянтная (точнее, антиагрегантная) активность реализуется посредством взаимодействия с компонентами системы активации тромбоцитов.

Активация тромбоцитов – это сложный многостадийный процесс, включающий несколько сигнальных путей и метаболических процессов. Наиболее значимые из них включают регуляцию активности тромбоцитов изменением количества ионов кальция, активацию процессов адгезии и агрегации Ras-связанным белком 1, а также метаболический путь обмена арахидоновой кислоты.

На основе данных, содержащихся в базе KEGG (Kanehisa M. et al., 2023), был составлен список известных химических соединений, способных модулировать процессы активации тромбоцитов, а также молекулярные мишени, посредством которых реализуется биологическая активность. При составлении списка потенциальных мишеней были применены методы анализа естественных языков, основанные на алгоритмах машинного обучения. В результате было получено 30 возможных молекулярных мишеней, входящих в состав системы активации тромбоцитов. Для большинства мишеней известен тип взаимодействия (активация или ингибирование), а также специфические лиганды, которые могут быть использованы как положительный контроль при проведении молекулярного докинга.

На основе полученного списка мишеней был проведен молекулярный докинг всех выделенных в рамках диссертационного исследования индивидуальных соединений с молекулярными мишенями системы активации тромбоцитов. Предварительно молекулы-мишени были подготовлены в соответствии с рекомендациями (Bender B. J. et al., 2021). Лиганды были предварительно геометрически оптимизированы в программе NWChem на уровне теории функционала плотности в базисе 6-31G. Для проведения расчетов была использована программа AutoDock Vina с оценочной функцией AutoDock Vina (Forli S. et al., 2016). При значениях аффинности менее 7 ккал/моль взаимодействие лиганда с молекулой-мишенью считалось вероятным. В данном случае основная цель докинга заключалась в ранжировании выделенных соединений по критерию вероятности взаимодействия с лигандами. На основании результатов моделирования *in silico* можно сделать вывод о том, что исследуемые соединения потенциально могут взаимодействовать со многими молекулами, входящими в систему активации тромбоцитов. В частности, аффинность по отношению к циклооксигеназе (ЦОГ) 2-го типа, играющей важную роль в системе свертывания крови, у многих соединений группы EN выше, чем у положительного контроля – ацетилсалициловой кислоты (аспирина).

В Таблице 5 приведены ранжированные аффинности в порядке убывания первых десяти соединений среди всех изученных в отношении ЦОГ 1-го и 2-го типов (Таблицы 5 и 6 соответственно).

Таким образом, в результате проведения молекулярного докинга было установлено, что наиболее перспективными соединениями для детального исследования на биологических моделях системы гемостаза организма человека определены соединения,

выделенные из *Emeptrum nigrum* и относящиеся к производным флавоноидов (EN56), бибензила (EN19, EN48, EN15), 9,10-дигидрофенантрена (EN20, EN55), халконов (EN58, EN51) и дигидрохалконов (EN54, EN23, EN59, EN52), а также соединения, выделенные из *Rubus chamaemorus* и относящиеся к таннинам (RC14).

В ходе выполнения диссертационного исследования также была построена и реализована имитационная модель системы активации тромбоцитов и получены результаты численных экспериментов, на качественном уровне согласующиеся с результатами экспериментальных измерений *in silico*. Разработан численный симулятор активации тромбоцитов, реализованный в виде программы для ЭВМ (Свидетельство RU 2023680120).

Таблица 5 – Ранжированная афинность исследуемых соединений в отношении циклооксигеназы 1-го и 2-го типов

Соединение	Аффиность в отношении ЦОГ 1, ккал/моль	Соединение	Аффиность в отношении ЦОГ 2, ккал/моль
EN58	-7,99	EN55	-8,74
EN51	-7,74	EN54	-8,56
EN52	-7,49	EN52	-8,54
EN19	-7,36	EN59	-8,2
EN23	-7,30	EN20	-8,19
EN59	-7,05	EN23	-8,19
EN48	-7,02	EN56	-8,13
EN15	-6,88	EN58	-8,04
EN54	-6,70	RC14	-7,92
Аспирин	-6,49	EN51	-7,91

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВЫДЕЛЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Результаты исследования влияния суммарных экстрактов и индивидуальных веществ, выделенных из исследуемых растений, на показатели активации и агрегации тромбоцитов, а также на показатели коагуляционного звена гемостаза представлены в Таблице 6.

Скрининг антикоагуляционной активности *in vitro* показал, что исследуемые растворы индивидуальных веществ показали различную степень выраженности влияния на плазменный компонент системы гемостаза, проявляющуюся изменением показателя внутреннего пути свертывания крови – АПТВ. В указанной концентрации растворы индивидуальных веществ не влияли на показатель концентрации фибриногена и протромбиновое время. Показатели удлинения АПТВ по отношению к контролю ни одного из исследуемых растворов выделенных индивидуальных веществ не превышали значения гепарина натрия.

Скрининг антиагрегационной активности *in vitro* показал, что растворы индивидуальных веществ под лабораторными шифрами EN-58, EN-53, EN-17, OA-1, OA-2, EN-23, RC-7, RC-4, IL-23, IL-22, IL-21, EN-35, EN-39, EN-37, IL-11, SC-2, SC-1, SC-10 проявили антиагрегационную активность на уровне ацетилсалициловой кислоты в условиях *in vitro* (по уровню снижения максимальной агрегации тромбоцитов – показатель МА в Таблице 6). Растворы веществ EN-56, EN-55, RC-14 и EN-48 проявили антиагрегационную активность, превосходящую значения ацетилсалициловой кислоты.

В результате скрининга активации тромбоцитов *in vitro* установлено, что растворы индивидуальных веществ EN54, EN15, RC-5, IL-10, IL-3, IL-9 и ацетилсалициловая кислота не влияли на уровень экспрессии CD62. Раствор вещества EN19 увеличивал экспрессию CD62. Растворы веществ EN20, RC6, IL-2, IL-12 слабо снижали экспрессию CD62. Остальные растворы индивидуальных соединений и экстрактов *Empetrum nigrum*, *Solidago canadensis*, *Rubus chamaemorus*, *Iris lactea*, *Ononis arvensis* полностью подавляли активацию тромбоцитов в изученных концентрациях.

Таким образом, в результате скринингового исследования фармакологической активности *in vitro* в отношении системы гемостаза установлены вещества, обладающие антиагрегационной и антикоагуляционной активностью. Антиагрегационную активность на уровне ацетилсалициловой кислоты в условиях *in vitro* проявили индивидуальные вещества, относящиеся к производным халконов, дигидрохалконов, 9,10-дигидрофенантрена, гликозидов глюкоуроновых кислот, флавоноидов, изофлавоноидов, С-гликозидов флавоноидов и таннинов. Из 38 изученных индивидуальных веществ 4 вещества проявили антиагрегационную активность, превосходящую значения ацетилсалициловой кислоты: 3 вещества, выделенные из *Empetrum nigrum* (5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванон, 5-гидрокси-2,3,4-триметокси-9,10-дигидрофенантрен,

1-(3-гидроксифенил)-2-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-этан) и 1 вещество, выделенное из *Rubus chamaemorus* (4-O- α -L-арабинофуранозилэллаговая кислота). Все четыре указанных соединения запатентованы в качестве средств, обладающих антиагрегационной активностью. Патенты RU 2806331, RU 2808460, RU 2811240, RU 2812630 представлены в Приложении № 2 к настоящей диссертационной работе. Полученные результаты скринингового исследования фармакологической активности *in vitro* выделенных из растительного сырья индивидуальных веществ в отношении системы гемостаза не противоречат и соответствуют результатам исследований *in silico*, которые отражены в Главе 4 настоящей диссертационной работы.

В ходе настоящего диссертационного исследования предполагалось также изучить вклад выделенных индивидуальных веществ в фармакологическую активность суммарных экстрактов растений, оценить взаимодействие индивидуальных соединений друг с другом при эквимольном смешении.

В результате выполненного скрининга установлено, что наиболее перспективным для дальнейшего изучения с целью последующей разработки средств для лечения сердечно-сосудистой и кровеносной систем является экстракт *Empetrum nigrum*, из которого были получены индивидуальные соединения под шифрами EN-56, EN-55 и EN-48. В ходе эксперимента было изучено влияние на систему гемостаза смесей данных индивидуальных соединений при помощи серии опытов по последовательному введению в реакционную среду данных соединений до достижения целевой концентрации 2,5 мг/кг и серии опытов с параллельным приготовлением растворов данных соединений до целевых значений концентраций в условиях *ex temporare*. Результаты описанного эксперимента демонстрируют отсутствие различий между двумя способами введения выделенных из экстрактов индивидуальных компонентов.

Эмпирические данные, указанные в Таблице 6, свидетельствуют о том, что смешение индивидуальных соединений EN-56, EN-55 и EN-48 не привело к изменению активности в отношении процессов активации тромбоцитов (индивидуальные вещества и их смеси не вызывают активацию тромбоцитов и полностью подавляют активацию АДФ).

Наибольший интерес представляют результаты по оценке антиагрегационного и антикоагуляционного действия растворов индивидуальных соединений и их смесей. Установлено, что эквимольное смешение индивидуальных соединений EN-56, EN-55 и EN-48 приводит к снижению антиагрегационной и антикоагуляционной активности (возможно, за счет относительного снижения наиболее активных компонентов в растворе (эффект разбавления), либо за счет конкурирующего взаимодействия за одну мишень).

В завершение настоящего исследования проводили сравнительную оценку влияния на показатели агрегации тромбоцитов растворов выделенных индивидуальных соединений и соответствующих растворов суммарных экстрактов изученных растений (Таблица 6).

Установлено, что из экстракта *Empetrum nigrum*, проявляющего антиагрегационную активность на уровне ацетилсалициловой кислоты, выделено 17 индивидуальных соединений. 8 соединений проявили антиагрегационную активность, сопоставимую со значениями показателей активности экстракта *Empetrum nigrum* L. Однако соединения EN-48, EN-55 EN-56 проявили антиагрегационную активность, превосходящую значения исходного экстракта в среднем в 1,7 раза. Соединения под шифрами EN-56, EN-51, EN-58, EN-59, EN-48, EN-35, EN-39 и EN-37 удлиняли lag-период эффективнее экстракта более чем в 3 раза, а также удлиняли АПТВ более чем в 1,5 раза.

Из экстракта *Ononis arvensis* было выделено три индивидуальных соединения. Соединение ОА-2 проявило антиагрегационную активность, превосходящую таковую у ацетилсалициловой кислоты, а соединение ОА-1 подавляло агрегацию тромбоцитов на уровне ацетилсалициловой кислоты и исходного экстракта. Важно отметить, что оба соединения эффективнее ацетилсалициловой кислоты пролонгируют lag-период, который соответствует «реакции высвобождения тромбоцитов», при этом у суммарного экстракта *Ononis arvensis* данный эффект отсутствует. Также установлено, что соединения ОА-1, ОА-2 и ОА-6 увеличивают АПТВ более чем в 3 раза по сравнению с исходным экстрактом.

Среди пяти индивидуальных выделенных веществ, выделенных из *Rubus chamaemorus*, соединения RC-14, RC-7 и RC-4 проявили антиагрегационную активность, превосходящую значения суммарного экстракта по показателям удлинения lag-периода и снижения максимальной амплитуды. Соединение RC-5 подавляло агрегацию тромбоцитов на уровне экстракта. Следует отметить, что все выделенные индивидуальные вещества в среднем эффективнее в 2 раза увеличивали АПТВ по сравнению с экстрактом.

Экстракт *Iris lactea* проявил антиагрегационную активность, превосходящую значения ацетилсалициловой кислоты. Медиана снижения показателя МА для данного экстракта составила 17,4 %, против 13,4 % значений ацетилсалициловой кислоты. Среди девяти выделенных индивидуальных соединений из *Iris lactea* вещества IL-23, IL-11, IL-21, IL-2 проявили активность на уровне референтного антиагреганта, а соединение IL-22 оказывало эффект на уровне экстракта. Однако IL-23, IL-22, IL-21 и IL-11 эффективнее экстракта пролонгировали lag-период в среднем на 25 %, а соединения IL-22, IL-2, IL-10, IL-12, IL-3, IL-9 и IL-11 увеличивали АПТВ более чем в 2 раза по сравнению с экстрактом.

Из четырех веществ, выделенных из *Solidago canadensis* L., индивидуальные соединения SC-2, SC-1, SC-10 подавляли агрегацию тромбоцитов на уровне исходного экстракта и ацетилсалициловой кислоты, однако эффективнее более чем в 2,5 раза удлиняли lag-период и АПТВ.

Таким образом, активность ряда индивидуальных соединений превосходит как антиагрегационную, так и антикоагуляционную активность суммарных экстрактов растений, из которых они были выделены.

Таблица 6 – Влияние растительного сырья и препаратов сравнения на показатели системы гемостаза, Ме (0,25-0,75).

№	Шифр	Латентный период, % к контролю	Максимальная амплитуда, % к контролю	Скорость агрегации, % к контролю	Время достижения МА, % к контролю	Удлинение АПТВ, % к контролю	CD62	
							АДФ-	АДФ+
1.	EN-56	+23,6 (22,7-25,0)**, ##, α	-19,5 (16,8-21,6)**, #, α	-19,7 (18,9-21,2)*, #, α	-21,2 (19,0-22,4)**, ##, α	7,3 (5,6-10,2)*	1,1 (0,9-1,2)*	1,0 (0,8-1,2)**, ‡
2.	EN-51	+15,0 (13,1-16,7)*, ##, α	-3,6 (2,0-5,7)#, α	-11,0 (9,8-12,1)*, α	-17,9 (15,7-19,6)*, ##, α	8,7 (6,1-10,3)*	1,4 (1,2-1,6)*	1,2 (1,1-1,4)**, ‡
3.	EN-58	+12,5 (10,6-14,9)*, ##, α	-16,6 (15,7-18,5)*, α	-21,5 (17,7-24,5)**, ##, α	+7,6 (5,6-10,3)*	9,2 (6,3-10,7)*	1,2 (1,1-1,4)*	1,4 (1,2-1,5)**, ‡
4.	EN-53	+2,3 (1,4-4,8)#	-15,4 (14,3-17,8)*, α	-12,6 (10,4-15,9)*, α	+14,8 (12,6-18,9)**, #	6,6 (5,8-7,5)*	1,3 (1,1-1,4)*	1,1 (1,0-1,4)**, ‡
5.	EN-17	+7,6 (6,7-8,3)*, ##	-12,9 (10,9-14,7)*	+2,9 (2,5-3,3)##, α	-1,0 (0,6-1,6)#, α	10,1 (9,6-11,2)*, α	1,4 (1,3-1,5)*	1,2 (1,1-1,5)**, ‡
6.	EN-55	+5,1 (4,4-8,6)#	-20,4 (18,5-23,9)**, #, α	-28,4 (24,6-30,2)**, ##, α	+21,4 (15,4-24,8)**, #, α	8,4 (7,5-11,3)*	1,2 (1,0-1,4)	1,4 (1,2-1,6)**, ‡
7.	EN-20	+0,3 (0,5-1,5)#, α	-0,7 (0,4-1,1)##, α	+17,4 (15,8-19,6)*, ##, α	-20,3 (18,8-22,4)**, ##, α	9,3 (8,2-11,7)*, α	1,2 (1,1-1,4)*	12,3 (10,5-14,6)**, ††
8.	EN-23	+3,0 (1,9-4,8)#	-16,6 (14,7-17,8)*, α	-12,6 (10,4-15,9)*, α	+14,8 (12,6-18,9)**, #	7,6 (6,5-9,3)*	1,1 (1,0-1,3)*	1,3 (1,2-1,4)**, ‡
9.	EN-52	+4,5 (3,9-5,6)#	-6,1 (5,0-7,1)*, ##, α	-3,1 (2,6-3,8)#	+11,5 (10,6-14,4)*	8,4 (7,9-9,6)*	1,2 (1,1-1,4)*	1,3 (1,1-1,6)**, ‡
10.	EN-54	-2,0 (0,3-3,9)α	-1,1 (0,5-1,6)#, α	-3,7 (1,3-4,1)##	-7,3 (5,3-9,6)*, ##, α	7,5 (6,7-9,2)*	1,3 (0,9-1,4)*	18,9 (19,4-22,5)*, ††
11.	EN-59	+13,0 (10,2-16,1)*, ##, α	-10,3 (8,5-13,7)*	-31,2 (27,4-35,7)**, #, α	-3,6 (2,0-4,5)##, α	5,7 (4,3-8,3)*	1,1 (1,0-1,4)*	1,2 (1,1-1,4)**, ‡
12.	EN-15	-17,1 (15,6-18,7)*, #, α	-6,7 (4,7-9,1)*, #	-7,9 (6,7-8,5)*	-9,1(6,7-11,4)*, ##, α	9,6 (8,3-11,4)*, α	1,2 (1,1-1,4)*	17,1 (15,6-18,3)*, ††
13.	EN-19	-25,2 (21,7-28,7)**, ##, α	-4,8 (3,9-5,5)#, α	+2,0 (1,1-3,8)##, α	-37,8 (28,5-34,4)**, ##, α	2,7 (1,2-3,5)	1,3 (0,8-1,5)*	21,7 (19,7-25,4)**, ††

Продолжение Таблицы 6

№	Шифр	Латентный период, % к контролю	Максимальная амплитуда, % к контролю	Скорость агрегации, % к контролю	Время достижения МА, % к	Удлинение АПТВ, % к контролю	CD62	
							АДФ-	АДФ+
14.	EN-48	+21,7 (20,3-23,8)**, ##, α	-19,4 (17,8-21,5)**, #, α	-15,4 (13,7-18,7)*, #, α	-18,9 (16,4-20,3)**, ##, α	7,4 (7,1-9,5)*	1,2 (1,1-1,4)*	1,4 (1,2-1,5)**, ‡
15.	EN-35	+24,2 (22,9-26,2)**, ##, α	-16,5 (13,2-18,9)*, α	-27,3 (26,3-28,1)**, ##, α	-32,6 (29,2-34,4)**, ##, α	8,6 (6,1-10,9)*	1,4 (1,2-1,5)*	1,1 (0,9-1,3)**, ‡
16.	EN-39	+11,9 (10,7-15,6)*, ##, α	-15,0 (12,4-16,0)*, α	-12,2 (11,0-14,4)*, α	-26,8 (24,5-28,8)**, ##, α	5,2 (4,1-7,6)*	1,1 (0,9-1,2)*	1,2 (1,1-1,5)**, ‡
17.	EN-37	+29,0 (25,7-31,5)**, ##, α	-16,8 (14,5-18,3)*, α	-10,0 (8,7-10,6)*, α	-13,5 (11,5-15,4)*, ##, α	4,8 (3,7-6,9)*	1,3 (1,1-1,5)*	1,4 (1,2-1,5)**, ‡
18.	EN-56 + EN-55	+16,7 (14,3-18,5)**, #, α	-15,3 (14,8-16,3)**, α	-21,3 (19,8-22,6)**, #, α	-12,5 (10,4-13,9)*, ##, α	6,9 (5,2-8,1)*	1,4 (1,3-1,5)*	1,2 (1,1-1,5)**, ‡
19.	EN-56 + EN-48	+21,5 (18,3-23,6)**, #, α	-17,3 (15,8-19,5)**, α	-16,3 (15,3-18,1)**, #, α	-13,4 (10,5-14,7)*, ##, α	7,2 (7,1-8,5)*	1,2 (1,0-1,4)	1,4 (1,2-1,6)**, ‡
20.	EN-55 + EN-48	+18,5 (16,3-20,7)**, #, α	-16,9 (14,7-18,3)**, α	-17,1 (15,8-19,3)**, #, α	-10,1 (8,7-13,5)*, #, α	6,1 (5,4-7,3)*	1,1 (0,7-1,2)*	1,5 (1,2-1,7)**, ‡
21.	EN-56 + EN-55 + EN-48	+20,7 (18,3-22,9)**, #, α	-13,9 (11,4-14,8)**	-10,5 (8,9-12,7)*	-8,7 (7,4-10,3)*, #, α	5,3 (4,7-6,9)*	1,2 (0,9-1,4)*	1,1 (0,5-1,4)**, ‡
22.	<i>Empetrum nigrum</i>	+4,7 (3,9-5,8)*, #	-11,4 (10,5-13,9)*	-6,1 (5,8-8,3)*	+10,3 (8,7-12,5)*	4,9 (4,7-5,9)*	1,0 (0,9-1,2)*	1,2 (1,1-1,4)**, ‡
23.	RC-6	+14,8 (13,2-16,5)*, ##, β	-0,5 (0,2-0,9)##, β	+17,2 (15,6-19,4)*, ##, β	-21,1 (18,7-22,3)**, ##, β	8,4 (7,5-11,3)*, β	1,4 (1,2-1,5)*	11,3 (10,7-13,5)*, ††

Продолжение Таблицы 6

№	Шифр	Латентный период, % к контролю	Максимальная амплитуда, % к контролю	Скорость агрегации, % к контролю	Время достижения МА, % к	Удлинение АПТВ, % к контролю	CD62	
							АДФ–	АДФ+
24	RC-14	+14,9 (14,1-17,8)*, ##, β	-19,1 (16,8-20,7)**, #, β	-13,9 (12,8-17,1)*, #, β	-23,0 (21,6-27,9)**, ##	6,2 (5,1-7,3)*, β	1,1 (0,8-1,3)*	1,1 (0,9-1,2)**, ‡
25	RC-7	+10,4 (7,9-14,7)*, #	-12,8 (10,5-14,6)*, β	-17,4 (14,7-19,0)**, #, β	+34,8 (30,2-38,5)**, #, β	9,4 (8,2-10,7)*, β	1,1 (1,0-1,3)*	1,5 (1,2-1,6)**, ‡
26	RC-4	+23,1 (22,2-24,5)**, ##, β	-12,5 (11,9-14,1)**, β	-19,1 (18,3-20,6)*, #, β	-20,7 (18,5-21,9)**, ##, β	6,4 (5,5-8,9)*, β	1,3 (1,2-1,4)*	1,2 (1,1-1,4)**, ‡
27	RC-5	-17,9 (14,8-19,4)*, ##, β	-9,1 (7,6-10,7)*, #	+4,4 (3,8-5,0)#, β	-10,7 (6,8-13,7)*, ##, β	8,1 (6,2-9,3)*, β	1,4 (1,1-1,5)*	15,3 (13,7-17,2)*, ††
28	<i>Rubus chamaemorus</i>	+3,1 (2,9-4,5)*, #	-7,4 (6,1-8,8)*, #	-7,4 (5,6-10,3)*	-27,4 (25,3-30,2)**, ##	3,1 (2,5-4,3)	1,2 (0,9-1,2)*	1,1 (0,9-1,3)**, ‡
29	IL-23	+13,3 (10,5-16,4)*, ##, γ	-10,6 (8,8-14,0)*	-31,5 (27,7-36,0)**, #	-3,5 (1,9-4,4)## γ	4,6 (2,5-7,7)	1,0 (0,8-1,2)*	1,3 (1,1-1,5)**, ‡
30	IL-22	+28,7 (25,8-30,9)**, ##, γ	-17,3 (15,4-19,2)*, #	-8,3 (6,7-9,1)*, γ	-17,6 (14,3-20,9)*, ##, γ	6,5 (4,7-9,6)*, γ	1,2 (1,1-1,5)*	1,5 (1,4-1,6)**, ‡
31	IL-21	+24,9 (21,7-28,3)**, ##, γ	-16,9 (15,2-18,7)*	-7,9 (6,1-10,3)*	-19,4 (16,2-22,1)*, ##, γ	3,2 (2,8-5,4)	1,5 (1,2-1,6)*	1,3 (1,1-1,5)**, ‡
32	IL-2	-6,5 (5,2-7,4)*, ##	-10,5 (7,3-12,7)*, γ	-15,6 (14,3-16,6)*, #, γ	-25,9 (24,3-28,5)**, ##, γ	10,3 (8,5-12,7)*, γ	1,3 (1,1-1,6)*	9,4 (7,8-10,5)*, ‡†
33	IL-10	+1,0 (0,3-2,2)#, γ	+8,2 (7,3-10,4)*, ##, γ	+1,6 (0,7-3,4)##, γ	-10,4 (7,3-13,2)*, #, γ	11,2 (8,8-12,1)* γ	1,4 (1,1-1,7)*	16,3 (14,5-19,2)*, ††

Продолжение Таблицы 6

№	Шифр	Латентный период, % к контролю	Максимальная амплитуда, % к контролю	Скорость агрегации, % к контролю	Время достижения МА, % к	Удлинение АПТВ, % к контролю	CD62	
							АДФ–	АДФ+
34	IL-12	-3,1 (1,1-4,4)γ	+3,6 (2,2-5,4)##, γ	+18,4 (17,6-19,7)*, ##, γ	+1,8 (1,4-2,0)#, γ	7,5 (4,3-10,6)*, γ	1,2 (1,1-1,4)*	13,2 (11,1-15,4)**, ††
35	IL-3	-3,7 (1,9-4,6)γ	+7,1 (5,5-8,0)*, ##, γ	+27,7 (24,3-29,6)**, ##, γ	-24,3 (20,3-28,1)**, ##, γ	9,2 (6,7-10,6)*, γ	1,3 (1,1-1,5)*	16,8 (13,4-18,5)*, ††
36.	IL-9	-5,9 (5,1-7,6)*, ##	-6,7 (5,1-7,8)*, ##, γ	-13,8 (10,6-17,7)*, γ	-11,8 (10,4-13,5)*, ##, γ	10,4 (8,9-11,8)*, γ	1,1 (0,8-1,3)*	19,2 (16,3-20,1)*, ††
37.	IL-11	+18,0 (16,6-21,3)*, ##, γ	-14,7 (13,4-17,5)*	-15,8 (14,5-17,4)*, #, γ	-29,4 (26,7-32,3)**, ##, γ	7,3 (6,2-10,1)*, γ	1,4 (1,2-1,5)*	1,2 (0,9-1,5)*, †
38.	<i>Iris lactea</i>	-8,7 (7,4-10,1)*, #	-17,4 (14,5–19,7)**, #	-28,3 (25,6–30,4)**, ##	+10,1 (8,3–11,7)*	3,1 (2,8-3,5)	1,1 (1,1-1,2)*	1,3 (1,2-1,4)**, †
39.	SC-2	+19,1 (16,6-22,5)*, ##, μ	-11,0 (8,6-12,7)*	+32,6 (30,8-34,5)**, ##, μ	-30,6 (27,9-32,5)**, ##, μ	4,6 (3,4-5,8)	1,2 (1,1-1,4)*	1,0 (0,8-1,2)**, †
40.	SC-1	+31,3 (28,9-35,3)**, ##, μ	-13,9 (11,7-15,3)*	-16,1 (14,6-17,5)*, #	-21,7 (18,9-23,8)**, ##, μ	7,2 (5,4-9,7)*, μ	1,3 (1,1-1,5)*	1,3 (1,1-1,6)**, †
41.	SC-10	+29,1 (24,9-29,9)**, ##, μ	-14,7 (13,9-17,1)*	-12,6 (10,9-15,8)*	-24,7 (23,3-29,8)**, ##, μ	5,9 (4,2-7,6)*	1,5 (1,2-1,6)*	1,1 (0,8-1,3)**, †
42.	SC-3	+6,3 (6,0-7,3)*, #	-2,1 (1,5-3,3)#, μ	+12,6 (10,5-15,2)*, #, μ	-20,8 (18,5-24,4)**, ##, μ	3,2 (3,1-5,5)	1,2 (1,1-1,4)*	1,3 (1,1-1,5)**, †
43.	<i>Solidago canadensis</i>	+8,4 (7,3–9,7)*, #	-12,3 (9,4-13,5)*	-13,5 (11,7–15,6)*, #	-7,2 (5,1–9,4)##	4,7 (3,5-5,1)	1,3 (1,2-1,4)*	1,3 (1,2-1,5)**, †

Продолжение Таблицы 6

№	Шифр	Латентный период, % к контролю	Максимальная амплитуда, % к контролю	Скорость агрегации, % к контролю	Время достижения МА, % к контролю	Удлинение АПТВ, % к контролю	CD62	
							АДФ-	АДФ+
44.	ОА-1	+30,2 (24,9-29,9)**, ##, Δ	-14,6 (13,9-17,1)*, Δ	-12,1 (10,8-15,7)*, Δ	-24,7 (23,3-29,8)**, ##, Δ	11,1 (9,3-12,1)*, Δ	1,1 (0,7-1,2)*	1,5 (1,2-1,7)**, ‡
45.	ОА-2	+30,0 (25,7-31,5)**, ##, Δ	-16,5 (14,6-18,3)*, #, Δ	-10,0 (8,7-10,6)*, Δ	-13,6 (11,6-15,5)*, ##	7,3 (5,6-10,2)*, Δ	1,2 (0,9-1,4)*	1,1 (0,5-1,4)**, ‡
46.	ОА-6	+0,6 (0,3-1,6)#, Δ	-3,7 (2,1-5,8)#	-11,1 (9,9-12,2)*, Δ	-18,0 (15,8-19,7)*, ##	9,4 (7,2-11,7)*, Δ	1,4 (1,2-1,6)*	1,4 (1,3-1,7)**, ‡
47.	<i>Ononis arvensis</i>	-7,8 (5,6-9,4)*, #	-11,5 (8,7-13,9)*	-24,7 (22,8-25,7)	-14,3 (12,6-18,5)	2,4 (2,1-3,5)	1,3 (1,2-1,4)*	1,2 (1,1-1,4)**, ‡
48.	Ацетилсалициловая кислота	-2,1 (1,1-2,6)	-13,7 (10,8-16,4)*	-10,5 (7,6-12,3)*	+10,5 (8,7-13,4)*	-	1,3 (1,1-1,4)*	16,4 (14,5-17,3)*, ‡‡
49.	Пентоксифиллин	-	-	-	-	-	1,2 (1,1-1,4)*	1,5 (0,7-1,1)**, ‡
50.	Гепарин натрия	-	-	-	-	20,3 (19,7-21,4)*	-	-

Примечание. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$ - в сравнении с контролем; # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.001$ - в сравнении с ацетилсалициловой кислотой; $\alpha p \leq 0.05$ - в сравнении с экстрактом *Empetrum Nigrum*; $\beta p \leq 0.05$ - в сравнении с экстрактом *Rubus Chamaemorus*; $\gamma p \leq 0.05$ - в сравнении с экстрактом *Iris Lactea*; $\mu p \leq 0.05$ - в сравнении с экстрактом *Solidago Canadensis*; $\Delta p \leq 0.05$ - в сравнении с экстрактом *Ononis Arvensis*; соединения vs гепарин натрия при $p \leq 0.05$. уровень статистической значимости различий признаков групп после активации АДФ: ‡ - $p > 0,05$, ‡‡ - $p \leq 0,05$. CD62АДФ- - экспрессия CD62 до воздействия АДФ, CD62АДФ+ - экспрессия CD62 после воздействия АДФ. n=6.

ГЛАВА 6. БАЗОВЫЙ АЛГОРИТМ И ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ МЕТОДОЛОГИИ ПОИСКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ КАНДИДАТОВ НА ОСНОВЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В результате выполненного диссертационного исследования разработана и предложена методология поиска потенциальных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения. Воспроизводимость методологии была апробирована на классе полифенольных соединений.

Базовый алгоритм методологии представлен на Рисунке 3 и включает следующие этапы исследования:

1. Выбор объектов исследования, отвечающих основным научно-практическим критериям: а) преобладающей химической группой веществ в объектах исследования являются фенольные соединения; б) изучаемые растения относятся к различным таксономическим группам (семействам); в) изучаемые растения являются преимущественно дикорастущими, должны иметь обеспеченную сырьевую базу и потенциал к культивированию; г) в качестве материала для исследования рационально использовать надземные части растений как наиболее легко воспроизводимые источники основных вторичных метаболитов.

2. Заготовка сырья и выделение индивидуальных соединений целевой химической группы, точная идентификация их химической структуры.

3. Оценка потенциала биологической активности выделенных индивидуальных соединений *in silico* с интегральным использованием компьютерных сервисов Way2Drug и SwissPredict; определение наиболее перспективной модельной системы организма человека для изучения биологического действия исследуемых индивидуальных соединений на наибольшее количество вероятных мишеней.

4. Скрининг потенциальной фармакологической активности выделенных индивидуальных соединений *in silico* с использованием сервиса SwissPredict, анализируя вероятные сочетанные эффекты на большинство мишеней в исследуемых метаболических путях, для прогностического определения целевой группы перспективных лекарственных кандидатов.

5. Скрининг фармакологической активности выделенных индивидуальных веществ на воспроизводимых моделях выбранной системы организма человека *in vitro*; определение целевой группы перспективных лекарственных кандидатов-лидеров.

6. Изучение взаимного влияния лекарственных кандидатов-лидеров при эквимольном смешении на фармакологическую активность на воспроизводимых моделях выбранной системы организма человека *in vitro*.

Основные принципы методологии, которые определяют теоретические и практические особенности проведения исследований, обеспечивают воспроизводимость научных экспериментов, состоят в следующем:

1. Выделение индивидуальных веществ единой химической группы из растительного сырья по универсальной неизбирательной методике;

2. Обеспечение относительной химической чистоты выделенных индивидуальных соединений, недопустимость примесей веществ сходной химической структуры;

3. Применение современных физико-химических методов анализа (ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия высокого разрешения) для точного установления и подтверждения химической структуры молекул выделенных веществ, в том числе для определения изомеров, конформеров и др.

4. Выделение достаточного количества по массе индивидуальных веществ для осуществления последующего фармакологического скрининга и выбора целевых наиболее перспективных субстанций, предполагаемых к дальнейшей разработке.

5. Применение сочетанного фармакологического скрининга *in silico* для установления оптимальной экспериментальной системы организма и уточнения модели фармакологического скрининга *in vitro*.

6. Выбор оптимальной модели фармакологического скрининга *in vitro*, позволяющей прямо или опосредованно изучить эффективность действия индивидуальных соединений растительного происхождения на максимальное число органов и систем организма.

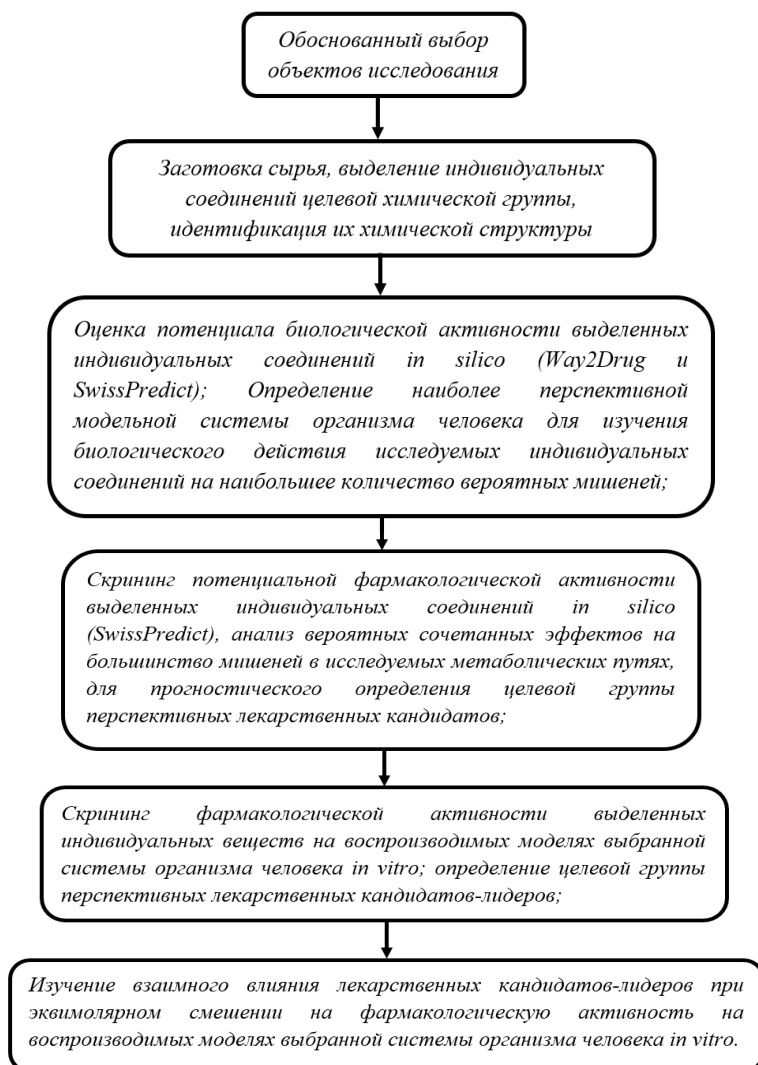


Рисунок 3 – Базовый алгоритм методологии исследования

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На основании данных изученной литературы предложены критерии и обоснован выбор растительных объектов диссертационной работы, а также определены методы комплексного экспериментального исследования. В результате, в качестве объектов исследования выбраны надземные части *Empetrum nigrum*, *Iris lactea*, *Ononis arvensis*, *Solidago canadensis* и листья *Rubus chamaemorus*. Все указанные объекты соответствуют следующим критериям: а) преобладающей химической группой веществ в объектах исследования являются фенольные соединения; б) изучаемые растения относятся к различным таксономическим группам (семействам); в) изучаемые растения являются преимущественно дикорастущими, должны иметь обеспеченную сырьевую базу и потенциал к культивированию; г) в качестве материала для исследования рационально использовать надземные части растений как наиболее легко воспроизводимые источники основных вторичных метаболитов. Для выполнения задач диссертационной работы выбраны методы химического анализа и разделения: колоночной хроматография, ВЭЖХ, МС, ЯМР-спектроскопия. Для проведения фармакологического скрининга выбраны как современные методы *in silico*, так и традиционные методы *in vitro*, которые в данном случае являются более релевантными и воспроизводимыми по сравнению с методами *in vivo*.

2. Проведено подробное исследование фенольных соединений, содержащихся в надземной части *Empetrum nigrum*, *Iris lactea*, *Ononis arvensis*, *Solidago canadensis* и листьях *Rubus chamaemorus*. В результате выделены и структурно идентифицированы 38 индивидуальных соединений, 8 из которых являются новыми природными. Из надземной части *Empetrum nigrum* выделены 1 производное флавоноидов, 3 таннина, 3 производных бибензила (из них новое природное соединение – **1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-фенил этан**), 4 производных 9,10-дигидрофенантрена (из них новое природное соединение – **6-гидрокси-2,3,4-триметокси-9,10-дигидрофенантрен**), 4 производных дигидрохалконов (из них новое природное соединение – **2', 4'-диметокси дигидрохалкон**), 2 производных халкона. Из листьев *Rubus chamaemorus* выделены 3 производных гликозидов глюконовых кислот, 2 таннина (из 1 новое природное соединение – **4-O- α -L-арабинофуранозилэллаговая кислота**). Из надземной части *Iris lactea* выделены 8 производных С-гликозидов флавоноидов (из них 4 новых природных соединения – **5-гидрокси-7,4'-диметоксифлаво-8-С-(2''-О- α -L-рамнопиранозил)-b-D-глюкопиранозид (изоэмбинин); 4^{'''}-ацетилэмбинин; 2^{'''},4^{'''}- диацетилэмбинин; 6^{''},4^{'''}-диацетилэмбинин;**), 1 производное ксантона. Из надземной части *Ononis arvensis* выделены 1 производное флавоноидов и 2 производных изофлавоноидов. Из надземной части *Solidago canadensis* выделены 4 производных флавоноидов. Разработаны 38 паспортов субстанций для выделенных индивидуальных соединений, сформирован реестр индивидуальных веществ фенольной природы.

3. В результате предварительного анализа и обобщения результатов прогнозирования *in silico* Way2Drug и SwissPredict возможных видов биологической

активности **система гемостаза организма человека** определена как наиболее перспективная для последующего фармакологического скрининга методами *in silico* и *in vitro* с учётом возможности исследования биологического действия на наибольшее количество вероятных мишеней.

4. В результате проведения молекулярного докинга SwissPredict наиболее перспективными соединениями для детального исследования на биологических моделях системы гемостаза организма человека определены соединения, выделенные из *Empetrum nigrum* и относящиеся к производным флавоноидов, бибензила, 9,10-дигидрофенантрена, халконов и дигидрохалконов, а также соединения, выделенные из *Rubus chamaemorus* и относящиеся к таннинам. Разработан численный симулятор активации тромбоцитов, реализованный в виде программы для ЭВМ.

5. В результате скрининга фармакологической активности выделенных индивидуальных веществ и суммарных экстрактов *in vitro* на моделях системы гемостаза организма человека установлено, что индивидуальные фенольные соединения обладают выраженной антиагрегационной активностью. Активность ряда соединений превосходит как антиагрегационную, так и антикоагуляционную активность суммарных экстрактов растений, из которых они были выделены. Антиагрегационную активность на уровне ацетилсалициловой кислоты в условиях *in vitro* проявили индивидуальные вещества, относящиеся к производным халконов, дигидрохалконов, 9,10-дигидрофенантрена, гликозидов глюкуроновых кислот, флавоноидов, изофлавоноидов, С-гликозидов флавоноидов и таннинов. Из 38 изученных индивидуальных веществ 4 вещества проявили антиагрегационную активность, превосходящую значения ацетилсалициловой кислоты: 3 вещества, выделенные из *Empetrum nigrum* (**5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванон**, **5-гидрокси-2,3,4-триметокси-9,10-дигидрофенантрен**, **1-(3-гидроксифенил)-2-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-этан**) и 1 вещество, выделенное из *Rubus chamaemorus* (**О-α-L-арабинофуранозилэллаговая кислота**). Все 4 указанные соединения запатентованы в качестве средств, обладающих антиагрегационной активностью. Таким образом, определены 4 наиболее перспективных лекарственных кандидата-лидера для последующей фармацевтической разработки средств для лечения заболеваний сосудистой и кровеносной систем.

6. Установлено, что эквимольное смешение растворов кандидатов-лидеров приводит к снижению антиагрегационной и антикоагуляционной активности исследуемых растворов *in vitro*, но не приводит к изменению активности в отношении процессов активации тромбоцитов *in vitro*.

7. На основании полученных эмпирических данных сформулированы основные принципы и базовый алгоритм предлагаемой методологии поиска потенциальных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Загорулько, Е. Ю. Количественное определение суммы флавоноидов в надземной части и настойке *Iris lactea (Iridaceae)* / Е. Ю. Загорулько, М. Г. Ожигова, И. И. Чемесова, **В. Г. Лужанин** // Химия растительного сырья. – 2018. – № 2. – С. 105–113.
2. Ивкин, Д. Ю. Эмбинин – перспективное кардиотоническое средство растительного происхождения / Д. Ю. Ивкин, **В. Г. Лужанин**, А. А. Карпов, С. М. Минасян, Я. И. Полещенко, А. Э. Мамедов, М. Н. Пovyдыш, В. В. Поройков, И. А. Наркевич // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2018. – Т. 24, № 3. – С. 166–170.
3. Сулоев, И.С. О некоторых видах рода Золотарник (обзор) / И.С. Сулоев, Н.А. Дудецкая, Л.С. Теслов, **В.Г. Лужанин**, Г.П. Яковлев // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». – 2019. – Т. 21, №. 6. – С. 68–76.
4. Уэйли, А. К. Обзор вторичных метаболитов морошки и их биологической активности / А.К. Уэйли, А.О. Понкратова, Л.С. Теслов, **В.Г. Лужанин** // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2020. – Т. 22, №. 7. – С. 50–59.
5. **Лужанин, В. Г.** Стальник полевой (*Ononis arvensis* L.) – перспективный источник веществ с различной биологической активностью / **В. Г. Лужанин**, А. О. Понкратова, А. К. Уэйли, Е. А. Гришукова, Г. П. Яковлев // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. –Т.23, № 11. – С. 3–9.
6. Сулоев, И.А. О стандартизации травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / И. А. Сулоев, А. О. Понкратова, Н. А. Дудецкая, Л. С. Теслов, **В. Г. Лужанин** // Фармация. – 2020. – Т. 69, № 8. – С. 13–20.
7. **Лужанин, В. Г.** Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / **В. Г. Лужанин**, А. К. Уэйли, А. О. Понкратова, Е. А. Гришукова, И. С. Сулоев, С. Н. Смирнов, Е. Б. Серебряков // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. –Т. 10, № 1. – С. 83–89.
8. Уэйли, А. К. Фитохимический анализ вторичных метаболитов полифенольной природы в листьях морошки обыкновенной (*Rubus chamaemorus* L.) / А. К. Уэйли, А. О. Понкратова, А. А. Орлова, Е. Б. Серебряков, С. Н. Смирнов, П. Прокш, Н. С. Ионов, В. В. Поройков, **В. Г. Лужанин** // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55, № 3. – С. 22-27.
9. Понкратова, А. О. Выделение и установление структуры трех димерных проантоцианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum* L. / А. О. Понкратова, А. К. Уэйли, А. А. Орлова, С. Н. Смирнов, Е. Б. Серебряков, **В. Г. Лужанин** // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. –Т. 10, № 2. – С. 80–86.
10. Уэйли, А. К. Анализ С-гликозидов флавонов и продуктов ступенчатого гидролиза их ацетатов в листьях *Rubus chamaemorus* L. / А. К. Уэйли, А. О. Понкратова, А. А. Орлова, Е. Б. Серебряков, С. И. Селиванов, С. В. Кривощев, М. В. Белоусов, П. Прокш, **В. Г. Лужанин** // Химия растительного сырья. – 2021. – № 2. – С. 257–265.
11. **Лужанин, В. Г.** Касатик молочно-белый (*Iris lactea* Pall.) – перспективный источник биологически активных веществ / **В. Г. Лужанин**, А. К. Уэйли, А. О.

Понкратова, Е. В. Жохова, М. А. Зингалюк, Н. И. Пряхина // Химия растительного сырья. – 2021. – № 3. – С. 5–17.

12. Лужанин, В. Г. Противомикробная активность соединений полифенольной природы / В. Г. Лужанин, А. К. Уэйли, А. О. Понкратова, В. В. Новикова, Е. А. Безверхняя // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – Т. 11, № 2. – С. 65–72.

13. Лужанин, В. Г. Влияние выделенных из *Empetrum nigrum* L. метаболитов на систему гемостаза в условиях *in vitro* / В. Г. Лужанин, А. В. Самородов, А. К. Уэйли, А. О. Уэйли, Г. П. Яковлев, И. А. Самылина // Фармация. – 2023. – № 8. – С. 25–32.

14. Whaley, A. K. New acetylated flavone C-glycosides from *Iris lactea* / A. K. Whaley, W. Ebrahim, M. El-Neketi, E. U. Ancheeva, F. C. Özkaya, N. I. Pryakhina, N. U. Sipkina, V. G. Luzhanin, Z. Liu, P. Proksch // Tetrahedron Letters. – 2017. – Vol. 58, I. 22. – P. 2171–2173.

15. Ponkratova, A. O. A new bibenzyl and 9,10-dihydrophenanthrene derivative from aerial parts of crowberry (*Empetrum nigrum* L.) / A. O. Ponkratova, A. K. Whaley, O. A. Balabas, S. N. Smirnov, P. Proksch, V. G. Luzhanin // Phytochemistry Letters. – 2021. – Vol. 42. – P. 15–17.

16. Ponkratova, A. O. A new dimethoxy dihydrochalcone isolated from the shoots of *Empetrum nigrum* L. / A. O. Ponkratova, A. K. Whaley, A. A. Orlova, S. N. Smirnov, E. B. Serebryakov, P. Proksch, V. G. Luzhanin // Natural Product Research. – 2022. – Vol. 36, I. 20. – P. 5142–5147.

17. Whaley, A. Isolation and characterization of a new flavone C-glycoside Isoembinin from *Iris lactea* L. along with its effects on platelet activation / A. Whaley, A. Ponkratova, N. Rukoyatkina, A. Prilepskaya, A. Bogoutdinova, E. Fock, S. Gambaryan, V. Luzhanin // Planta Medica. – 2022. – DOI 10.1055/a-1873-6785.

18. Whaley, A. Analysis of *Empetrum nigrum* L. lipophilic secondary metabolites, their metabolomic profiles and antioxidant activity / A. Whaley, D. Minakov, A. Orlova, A. Whaley, E. Fock, N. Rukoyatkina, S. Gambaryan, V. Luzhanin // Journal of Essential Oil Research. – 2023. – Vol. 35, I. 3. – P. 310–323.

19. Luzhanin, V. G. Development of embinin isolation technology from *Iris lactea* and the research of its pharmacological activity / V. G. Luzhanin, A. K. Whaley // Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy. – 2016. – Vol. 14, No. S1. – P. 42.

20. Наркевич, И. А. Фитофармацевтическая платформа как основа для поиска и разработки новых фармацевтических субстанций / И. А. Наркевич, В. Г. Лужанин, Н. С. Карташова // III Гаммермановские чтения : Сборник научных трудов научно-методической конференции, Санкт-Петербург, 31.01.17 – 03.02.17. – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФА, 2017. – С. 8–10.

21. Бабушкина, Е. В. О необходимости создания базы данных лекарственных растений флоры России / Е. В. Бабушкина, В. Г. Лужанин, М. Н. Пovyдыш // III Гаммермановские чтения : Сборник научных трудов научно-методической конференции, Санкт-Петербург, 31.01.17 – 03.02.17. – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФА, 2017. – С. 19–20.

22. Suloev, I. S. Isolation of individual flavonoids from *Solidago canadensis* L. / I. S. Suloev, **V. G. Luzhanin** // *Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. – 2017. – Vol. 15, No. S1. – P. 66.
23. Whaley, A. K. Isolation of three new flavonoid C-glycosides from *Iris lactaea* / A. K. Whaley, **V. G. Luzhanin** // *Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. – 2017. – Vol. 15, No. S1. – P. 75 – 76.
24. **Лужанин, В. Г.** Разработка технологии культивирования касатика молочно-белого и технологии производства эмбинина и его производных / **В. Г. Лужанин** // Двадцать вторая Санкт-Петербургская Ассамблея молодых ученых и специалистов: Сборник тезисов. – Санкт-Петербург: Изд-во СПбГУПТД, 2017. – С. 222.
25. Suloev, I. S. Investigation of substances of phenolic nature in the grass of *Solidago canadensis* / I. S. Suloev, **V. G. Luzhanin** // *Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. – 2018. – Vol. 16, No. S2. – P. 95.
26. Whaley, A. K. Phytochemical analysis of the leaves of *Rubus chamaemorus* / A. K. Whaley, **V. G. Luzhanin** // *Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. – 2018. – Vol. 16, No. S2. – P. 110.
27. Ионов, Н.С. Выявление скрытого фармакологического потенциала фитокомпонентов лекарственных растений на основе компьютерного прогноза / Н.С. Ионов, П. В. Погодин, А. А. Лагунин, М. Н. Пovyдыш, Е. В. Бабушкина, **В. Г. Лужанин**, В. В. Поройков // IV Гаммермановские чтения : сборник научных трудов 30-31 января 2019 г. – Москва: РУСАЙНС, 2018. – С. 132– 136.
28. Сулоев, И. С. О стандартизации лекарственного растительного сырья «золотарника канадского трава» / И. С. Сулоев, Н. А. Дудецкая, **В. Г. Лужанин** // IV Гаммермановские чтения : сборник научных трудов 30-31 января 2019 г. – Москва: РУСАЙНС, 2018. – С. 290– 292.
29. Уэйли, А. К. Предварительный фитохимический анализ листьев морошки обыкновенной / А. К. Уэйли, **В. Г. Лужанин** // IV Гаммермановские чтения : сборник научных трудов 30-31 января 2019 г. – Москва: РУСАЙНС, 2018. – С. 311– 312.
30. Бычкова, Н. В. Изучение иммуотропных эффектов флавонового гликозида эмбинина / Н. В. Бычкова, А. А. Калашникова, А. К. Уэйли, **В. Г. Лужанин**, Н. М. Калинина, Е. Б. Шустов, С. В. Оковитый // Профилактическая и клиническая медицина. – 2019. – № 4 (73). – С. 77–82.
31. Whaley, A. K. Phytochemical analysis of the flavonoids contained in the leaves of *Rubus chamaemorus* / A. K. Whaley, **V. G. Luzhanin** // *Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. – 2019. – Vol. 17, No. S1. – P. 76.
32. Suloev, I. S. The quantification of phenolic compounds in Canadian goldenrod (*Solidago canadensis* L.) / I. S. Suloev, A. O. Ponkratova, L. S. Teslov, **V. G. Luzhanin** // *Reviews of Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. – 2019. – Vol. 17, No. S1. – P. 66–67.
33. Whaley, A. K. Flavonoid C-glycoside rotameric conformational analysis using NMR-spectroscopy / A. K. Whaley, **V. G. Luzhanin**, S. I. Selivanov // MAGNETIC RESONANCE AND ITS APPLICATIONS SPINUS-2020, Санкт-Петербург, 29 марта-3 апреля 2020 г. – Санкт-Петербург: Изд-во ВВМ, 2020. – С. 282–284.

34. Понкратова, А. О. Использование метода высокоэффективной тонкослойной хроматографии для обнаружения фармакологически активных вторичных метаболитов в водянике черной *Empetrum nigrum* L. / А. О. Понкратова, А. К. Уэйли, В. Г. Лужанин, Е. В. Жохова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10, № S4. – С. 129–137.

35. Понкратова, А. О. Сравнительный фитохимический анализ образцов надземной части *Empetrum nigrum* L., собранных в различных регионах РФ, как перспективного источника фармакологически активных вторичных метаболитов / А. О. Понкратова, А. К. Уэйли, Е. В. Жохова, Е. А. Безверхняя, **В. Г. Лужанин** // Разработка и регистрация лекарственных средств.– 2021. – Т. 10, № S4. – С. 138–145.

36. **Лужанин, В. Г.** Поиск перспективных фармацевтических субстанций на основе индивидуальных растительных веществ фенольной природы / **В. Г. Лужанин**, И. А. Самылина // V Гаммермановские чтения. Сборник научных трудов по материалам научно-методической конференции (9-10 ноября 2023 г.). – Москва: РУСАЙНС, 2023. – С. 176–180.

ПАТЕНТЫ И СВИДЕТЕЛЬСТВА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Патент № 2808460 С1 Российская Федерация, МПК С07С 15/30, А61К 31/56, А61Р 7/02. Применение 2,3,4-триметокси-5-гидрокси-9,10-дигидрофенантрена в качестве средства, обладающего антиагрегационной активностью : № 2023111081 : заявл. 28.04.2023 : опубл. 28.11.2023 / **В. Г. Лужанин**, А. К. Уэйли, А. О. Уэйли, А. В. Самородов; заявитель ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.

2. Патент № 2806331 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/015, А61К 31/085, А61К 36/45. Применение 1-(3,5-дигидрокси-4-метоксифенил)-2-(3-гидроксифенил)-этана в качестве средства, обладающего антиагрегационной активностью: № 2023111080 : заявл. 28.04.2023 : опубл. 31.10.2023 / **В. Г. Лужанин**, А. К. Уэйли, А. О. Уэйли, А. В. Самородов; заявитель ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.

3. Патент № 2811240 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/7048, А61Р 7/02, С07Н 17/04. Применение 4-О- α -арабинофуранозилэллаговой кислоты в качестве средства, обладающего антиагрегационной активностью : № 2023112690 : заявл. 17.05.2023 : опубл. 11.01.2024 / **В. Г. Лужанин**, А. К. Уэйли, А. О. Уэйли, А. В. Самородов; заявитель ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.

4. Патент № 2812630 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/352, А61Р 7/02, С07D 311/32. Применение 5,7-дигидрокси-6,8-диметилфлаванона в качестве средства, обладающего антиагрегационной активностью : № 2023112688 : заявл. 17.05.2023 : опубл. 30.01.2024 / **В. Г. Лужанин**, А. К. Уэйли, А. О. Уэйли, А. В. Самородов; заявитель ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.

5. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2023680120 Российская Федерация. Численный симулятор активации тромбоцитов : № 2023669099 : заявл. 13.09.2023 : опубл. 26.09.2023 / **В. Г. Лужанин**, К. С. Бразовский; заявитель ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.