

На правах рукописи

Решетов Ярослав Евгеньевич

**СОСЦИОРЕЯ СПОРНАЯ (*SAUSSUREA CONTROVERSA* DC.) –  
ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК СРЕДСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
ОСТЕОМИЕЛИТА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2020

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

кандидат фармацевтических наук, доцент **Авдеева Елена Юрьевна**

**Научный консультант:**

доктор фармацевтических наук, доцент **Белоусов Михаил Валерьевич**

**Официальные оппоненты:**

**Ханина Миниса Абдуллаевна**, доктор фармацевтических наук, профессор, государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет», кафедра химии, заведующий кафедрой;

**Бомбела Татьяна Владимировна**, доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники, профессор.

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара.

Защита состоится «23» декабря 2020 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2, тел. (342) 2335501) Тел/факс (342)233-55-01.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46) и на сайте (<http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** Остеомиелит (ОМ) - воспалительный процесс костной ткани и костного мозга, вызванный бактериальной флорой. ОМ является острой медицинской и социальной проблемой. Частота случаев ОМ у людей с заболеваниями опорно-двигательного аппарата превышает 70%, при этом рецидивы наступают в 20-35% случаев, что приводит к повторным оперативным вмешательствам с высоким риском инвалидизации (Новомлинский В. В. и др., 2016, Lima A.L.L. et al., 2014). Ключевыми звеньями патогенеза ОМ являются иммуносупрессия, воспаление и резорбция костной ткани. Стандарт лечения ОМ включает хирургическую санацию и консервативную терапию антибиотиками, сочетанную с иммуномодулирующими и нестероидными противовоспалительными средствами (Приказ Минздравсоцразвития РФ № 520, 2005).

Комплексы биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения имеют ряд ценных терапевтических качеств, особенно при их использовании в комплексной терапии хронических патологий, за счет системного полимодального терапевтического действия, повышения адаптивного ресурса организма, высокого терапевтического индекса и низкого уровня побочных эффектов. Одним из перспективных направлений лечения ОМ является изыскание растительных источников БАВ, действующих на процессы репарации костной ткани, в сочетании с иммуномодулирующей и противовоспалительной активностью (Dan S. et al., 2017, Kuriya K. et al., 2019, Suzuki R. et al., 2019). В данном аспекте представляет интерес сосюра спорная (*Saussurea controversa* DC., род *Saussurea* DC.), произрастающая на территории РФ и успешно применяемая в народной медицине Сибири для лечения ОМ. Учитывая значительный ресурсный потенциал *S. controversa* DC. (Shurupova M.N. et al., 2019), возможность интродукции (Свиридова Т.П. 2012), применение в народной медицине в качестве противовоспалительного, иммуностропного, ранозаживляющего средства (Телятьев В.В. 1976, 1985), а так же, результаты предварительных экспериментальных исследований (Авдеева Е.Ю. и др., 2015, 2016, Перевозчикова Т.В. и др., 2016), данный растительный объект можно считать перспективным кандидатом для комплексного фармацевтического исследования. А изучение химического состава, фармакологических свойств БАС с последующей разработкой нормативной документации (НД) на лекарственное растительное сырье для комплексной терапии остеомиелита является актуальным.

### **Степень разработанности темы исследования.**

Ранее исследован химический состав и биологическая активность близкородственных с *S. controversa* DC. видов – с. иволистной (*S. salicifolia* L.) и с. горькой (*S. amara* L.). В траве с. иволистной обнаружены кумарины (умбеллиферон, эскулетин, скополетин); фенолокислоты (кофейная кислота); флавоноиды (кверцетин, апигенин, гиперозид); сесквитерпеновые лактоны (янерин, репин, цебеллин G, цинаропикрин). Установлена противоописторхозная и противоямблиозная активность этанольных

экстрактов травы с. иволистной (Нурмухаметова К.А., 2000) В надземной части с. горькой обнаружены фенолкарбоновые кислоты (кумаровая, коричная, изованилиновая, галловая кислоты); флавоноиды (рутин, кверцетин, лютеолин, мирицетин); кумарины (эскулин, эскулетин, хаплоперозид А, фраксетин, обтусинин); сесквитерпеновые лактоны (гроссгемин, репин, цинаропикрин) (Погодин И.С. и др., 2010). Установлена противоописторхозная и гепатопротекторная активность этанольных экстрактов надземной части с. горькой (Погодин И.С. и др., 2012). В то же время, химический состав с. спорной (*S. controversa* DC.) мало изучен. В литературных источниках имеются сведения о содержании полисахаридов, флавоноидов (Авдеева Е.Ю. и др., 2015, 2017), терпеноидах и фенилпропаноиде сиригине (Сырчина А.И., и др., 1998). Из метанольного экстракта надземной части (без цветоносов) *S. controversa* DC. были выделены n-алканы C<sub>23</sub>-C<sub>31</sub>, β-ситостерин, стигмастерин, кампестерин, кверцетин, рутин (Сырчина А.И., и др., 1993). В экспериментальных исследованиях *in vivo* выявлены остеогенная и иммуностропная активность *S. controversa* (Авдеева Е.Ю. и др., 2015, 2016, Перевозчикова Т.В. и др., 2016). Сведения о морфолого-анатомическом строении вегетативных органов *S. controversa* и биологической активности её БАВ отсутствуют в литературе.

Поскольку известно влияние фенольных соединений и полисахаридов некоторых растений на остеогенез (An J. et al., 2016, Dan S. et al., 2017, Ногсајада М.Н. et al., 2012, Zhang Y. et al., 2016), а в фармакопее РФ не представлены виды лекарственного растительного сырья, обладающие сочетанными остеогенными и иммуностропными свойствами, поиск перспективных источников, эффективных в комплексной терапии ОМ является актуальным направлением исследования.

**Цель исследования.** Комплексное фармакогностическое исследование надземной части *S. controversa* DC. для выявления групп БАВ, обладающих остеогенной и иммуностропной активностью и стандартизация сырья для разработки проекта ФС «Соссюреи спорной листья».

**Задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели:**

1. На основании анализа литературных данных обосновать выбор объекта и дизайна исследования.
2. Провести исследование химического состава листьев *S. controversa* DC., и экстракта на 40% этаноле, эффективного на модели экспериментального травматического остеомиелита.
3. Выявить индивидуальные соединения и группы БАВ листьев *S. controversa* DC., обладающие остеогенными и иммуностропными свойствами в моделях *in vitro*.
4. Провести морфолого-анатомическое исследование листьев *S. controversa* DC.
5. Разработать и валидировать методики стандартизации сырья «Соссюреи спорной листья».
6. Составить проект фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье «Соссюреи спорной листья».

### **Научная новизна.**

В результате фитохимического исследования *S. controversa* DC. идентифицировано 20 веществ различной химической природы, из которых 11 описаны для данного вида впервые (хлорогеновая, хинная, салициловая, урсоловая кислоты, дигидрокверцетин, умбеллиферон, валин, аргинин, треонин, лизин, глицин). Впервые исследован компонентный состав эфирного масла, идентифицировано 52 соединения. Препаративно выделены мажорные фармакологически активные компоненты экстракта *S. controversa* на 40% этаноле: полисахариды, гликозиды кверцетина (7-O- $\alpha$ -L-рамнозид-3-O- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина, 3-O- $\beta$ -D-диглюкозид-O- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина, рутин), хелидоновая кислота. Впервые охарактеризован полисахаридный комплекс *S. controversa* DC. Разработаны и валидированы методики стандартизации и установлены основные диагностические признаки сырья. Впервые определены острая токсичность, остеогенная и иммуотропная активность целевых компонентов экстракта листьев *S. controversa* DC. *in vitro* с использованием клеточных технологий. Впервые определено влияние компонентов экстракта листьев *S. controversa* DC. на NO-синтазную активность макрофагов.

**Практическая значимость.** Разработан проект ФС на сырье «Соссюреи спорной листья». Получен патент на средство для стимуляции роста клеток гранулоцитарного и лимфоидного ряда в костном мозге и регенерации костной ткани. Научно обосновано применение экстракта листьев *S. controversa* DC. в комплексном лечении остеомиелита, а также в качестве лекарственного растительного сырья с остеогенной и иммуотропной активностью. Для целей стандартизации обоснован выбор методик количественного определения целевых групп БАВ: полисахаридов, флавоноидов, хелидоновой кислоты. Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс и используются на кафедрах фармацевтического анализа, фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность диссертационного исследования подтверждена экспериментальными данными, полученными с использованием современных химических и физико-химических методов (ГЖХ, ВЭЖХ, УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии). Результаты исследований статистически обработаны при помощи программ Microsoft Office Excel 2007, Statistica 6.0 2006 с использованием критериев Стьюдента и Манна-Уитни.

Основные положения и результаты работы представлены на IV научно-практической конференции «Молодые учёные и фармация XXI века» (Москва, 2016), XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2017). 12-th International symposium on the chemistry of natural compounds (Tashkent, 2017), XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2017), X Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2018).

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Результаты исследования химического состава листьев *S. controversa* DC., и экстракта на 40% этаноле, эффективного на модели экспериментального травматического остеомиелита.
2. Результаты исследования острой токсичности; остеогенной и иммуностропной активности индивидуальных соединений и групп БАВ листьев *S. controversa* DC. на моделях *in vitro*.
3. Результаты морфолого-анатомического исследования листьев *S. controversa* DC.
4. Результаты разработки и валидации методик стандартизации сырья для внесения в проект ФС «Соссюреи спорной листья»

**Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов.** Автор принимал непосредственное участие в планировании и осуществлении всех этапов экспериментальной работы: лично проводил экспериментальные исследования, выполнял сбор, анализ и статистическую обработку данных. Автором подготовлены доклады, тезисы, рукописи статей, а также диссертация и автореферат, представленные к защите.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Диссертация соответствует паспорту специальности 14.04.02. – фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно области исследований, соответствующей: п. 2 – формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств; п. 3 – разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления; п. 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.

**Публикации материалов исследования.** По результатам диссертационной работы опубликовано 19 работ: 9 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, в том числе 7 работ по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, из которых 4 работы входят в базы цитирования SCOPUS; 1 патент РФ на изобретение и 5 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 188 страницах машинописного текста, содержит 42 таблицы и 34 рисунка; состоит из введения, пяти глав, выводов и заключения, списка использованных литературных источников, включающего 170 работ, 80 из них на иностранном языке, 5 приложений.

## Основное содержание работы

### 1. Объект и методы исследования

Объектом исследования явились листья с черешками *S. controversa* DC. заготовленные в фазу цветения в 2014-2018 г. в Иркутской области, Красноярском крае, Республике Хакасия.

Общий фитохимический анализ на группы БАВ проводили с помощью качественных реакций, БХ, ТСХ, ВЭЖХ. ВЭЖХ проводили на хроматографе (Shimadzu LC-20AD, Япония) с колонкой PerfectSil Target ODS-3 (MZ-Analysentechnik GMBH, Германия). Анализ эфирного масла проводили методом ГХ-МС на приборе Agilent 5890N с квадрупольным масс-селективным детектором, Agilent 5973N EI/PCI. Наличие неорганических компонентов в сырье устанавливали на масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Agilent 7900 JP 14,080,159 (Agilent Technologies, Япония). Разрушение органической матрицы проводили в микроволновой системе Speedwave MWS TM-3+ в присутствии азотной кислоты.

Выделение полисахаридных фракций (ПСФ) проводили с помощью экстракции водой и 0,7% раствором оксалата аммония, с последующим осаждением 95% этанолом. Содержание белка и урсонных кислот в ПСФ определяли спектрофотометрическим методом на приборе СФ-2000 (Россия). Молекулярно-массовые характеристики полученных ПС определяли методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии в сравнении с растворами стандартных образцов декстранов. Моносахаридный состав ПСФ определяли после кислотного гидролиза трифторуксусной кислотой с последующим получением ацетатов полиолов с добавлением мио-инозитола в качестве внутреннего стандарта. Ацетаты полиолов анализировали методом ГЖХ на хроматографе Varian 450-GC (Varian, США), оборудованном пламенно-ионизационным детектором с использованием капиллярной колонки VF-5 MS (Varian, США; 0,25 мм, 30 м), анализ проводили в температурном режиме от 175°C (1 мин) до 250°C (2 мин) со скоростью увеличения температуры 3°C/мин.

Для исследования мажорных компонентов активного экстракта из листьев *S. controversa* DC. получали экстракт на 40% этаноле и фракционировали его последовательной обработкой рядом растворителей с возрастающей полярностью (хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом).

Выделение индивидуальных соединений из полученных фракций осуществляли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (Lachema, Чехия) и полиамиде (Woelm, Германия), в качестве элюентов использовали системы хлороформ-метанол и этанол-вода в различных соотношениях. Температуру плавления индивидуальных веществ определяли на приборе Stuart SMF-38 (Bibby scientific, Великобритания). УФ-спектры снимали в этанольных растворах с концентрацией веществ  $10^{-4}$  моль/л на спектрометре HP 8453 UV-Vis spectrometer (Hewlett-Packard, Германия). Инфракрасные спектры снимали в таблетках с калия бромидом на приборе Nicolet 5700 (FT-IR, Thermo Fisher Scientific, США). Элементный CHN анализ проводили на анализаторе CarloErba 1106 (CarloErba, Италия). ЯМР-спектры снимали в дейтерированном метаноле

и диметилсульфоксиде на ЯМР спектрометре BrukerAV - 600 с рабочими частотами: 600.30 ( $^1\text{H}$ ) и 150,95 МГц ( $^{13}\text{C}$ ) (Bruker BioSpin GmbH, Германия). ГХ/МС спектры получали на масс-спектрометре Thermo Scientific DFS (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре паров 200–220 °С, с электронной ионизацией в 70 эВ.

Острую токсичность сухого экстракта определяли в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н., 2012). Иммуностимулирующую активность соединений определяли по их способности стимулировать продукцию оксида азота макрофагами *in vitro*.

Исследование остеогенной активности соединений и групп БАВ проводили по их способности стимулировать остеогенную дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК).

Морфолого-анатомический анализ листьев *S. controversa* проводили с помощью микроскопа «Axio Lab A1» (Carl Zeiss, Германия) при помощи программного обеспечения «Zen Lite 2011»

Определение показателей качества растительного сырья проводили в соответствии с Государственной фармакопеей XIV издания.

Количественное определение целевых БАВ проводили с помощью разработанных и валидированных методик, используя ВЭЖХ, спектрофотометрический и гравиметрический методы анализа.

При выполнении экспериментов использовали реактивы производства Sigma Aldrich (США), Merck (Германия), Supelco (США), Essentica (Болгария), ЛенРеактив (Россия).

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ОФС 1.1.0013.15 (Государственная фармакопея 14 издания). Для расчета использовали программы Statistica 6.0, Microsoft Office Excel, критерии Стьюдента, Манна-Уитни. При проявлении эффекта с уровнем значимости  $p \leq 0,05$  результаты эксперимента считали достоверными.

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Фитохимическое исследование листьев *S. controversa* DC.

В результате общего фитохимического исследования в листьях *S. controversa* DC. обнаружены тритерпеновые сапонины (идентифицированы олеаноловая и урсоловая кислоты), дубильные вещества смешанной группы, кумарины (умбеллиферон и эскулетин), флавоноиды (кверцетин, кемпферол и рутин), фенолкарбоновые кислоты (коричная, кофейная, хлорогеновая, галловая и хинная кислоты), полисахариды, аминокислоты (валин, аргинин, треонин, лизин и глицин) и сесквитерпеновые лактоны.

Из листьев *S. controversa* DC. получено эфирное масло (0,51 %  $\pm$  0,07%) в котором идентифицированы 52 компонента с преобладанием кислородсодержащих сесквитерпеноидов: кариофиллен оксида (10,4%), гумулен-6.7-оксида (6,2%) и спатуленола (3,7%). ЭМ отличается высоким содержанием одноосновных насыщенных карбоновых кислот, в частности

нонановой (15,7%) и пальмитиновой кислот (9,7%), также присутствуют нонаналь (6,4%) и кариофилла-3.8(13)-диен-5 $\alpha$ -ол (2,7%).

При исследовании элементного состава обнаружены 44 элемента, в том числе 5 макроэлементов (Ca, K, Mg, P, Na), 6 эссенциальных элементов (Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Cr) и 4 условно-эссенциальных элемента (Si, B, V, Li). Количественное содержание в сырье тяжелых металлов (Pb, Cd, Hg) не превышало предельно допустимые значения (Решетов Я.Е. и др., 2018).

Основываясь на литературных данных, растения, перспективные для лечения ОМ, содержат в мажорных количествах полисахариды (Телятьев В.В., 1985, Рюшина В.А. и др., 2010, Balick, M., 2014), флавоноиды (Шарова О.В. и др., 2007, Dan S. et al., 2017) и некоторые биоэлементы - Ca, Mg, P, B (Forrest H.N. et al., 2009, Eiji, T. et al., 2012).

Исходя из этого, следующим этапом нашей работы стало химическое исследование водорастворимых полисахаридов и фенольных соединений листьев *S. controversa* DC.

## 2. Выделение и характеристика полисахаридов

Сырье обрабатывали хлороформом и этилацетатом для удаления пигментов и этанолом для удаления фенольных соединений. Затем трижды по 30 мин экстрагировали водой очищенной в соотношении 1:50 при температуре 25 °С, экстракт фильтровали и концентрировали на роторном испарителе при температуре 35 °С. Полисахариды осаждали из концентрата 95% этанолом в соотношении 1:4. Осадок отфильтровывали, растворяли в воде, подвергали депротеинизации по методу Севага, диализовали и подвергали лиофилизации. Таким образом, получили фракцию полисахаридов – ФПС<sub>1</sub> с выходом 1,93%  $\pm$  0,35%. Шрот после экстракции вновь заливали водой очищенной в соотношении 1:65 и однократно экстрагировали при температуре 70 °С, в течение 5 часов. Экстракт фильтровали и концентрировали. Полисахариды осаждали из концентрата 95% этанолом в соотношении 1:4. Далее поступали, как описано выше. Таким образом, получили фракцию полисахаридов ФПС<sub>2</sub>, с выходом 0,74%  $\pm$  0,16%. Шрот после экстракции ФПС<sub>2</sub> заливали 0,7% раствором оксалата аммония в соотношении 1:50 и однократно экстрагировали при температуре 70 °С, в течение 5 часов. Экстракт фильтровали, концентрировали и обрабатывали вышеуказанным способом, получая, таким образом, фракцию пектиновых веществ – ФПВ с выходом 10,52%  $\pm$  1,58%.

В ФПС<sub>1</sub> полученных экстракцией холодной водой белок не обнаружен. В ФПС<sub>2</sub>, несмотря на многократную депротеинизацию, обнаружено значительное количества остаточного белка - 26,22  $\pm$  0,68%, а в ФПВ его содержание составило 2,51  $\pm$  0,14%.

Содержание урсоловых кислот в ФПС<sub>1</sub> составило 59,54%  $\pm$  0,35%, в ФПС<sub>2</sub> – 64,20%  $\pm$  0,59% соответственно. В ФПВ обнаружено 94,73%  $\pm$  0,26% урсоловых кислот в пересчете на галактуроновою кислоту. Молекулярно-массовые характеристики полученных фракций представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Показатели молекулярных масс фракций ПС *S. controversa* DC.

Полисахаридные фракции	Показатели молекулярных масс		
	Mw, кДа	Mn, кДа	Mw/ Mn
ФПС <sub>1</sub>	448,1	13,2	33,9
ФПС <sub>2</sub>	101,82	10,27	9,9
ФПВ	1430,8	91,9	15,6

Примечание: Mw - средневесовая молекулярная масса, Mn - среднечисленная молекулярная масса

Как видно из таблицы 1, фракции ФПС<sub>1</sub> и ФПВ имеют высокие значения молекулярных масс. По данным Yang L.C. et al. (2017) полисахариды с высокой молекулярной массой могут являться носителями иммуностропной активности.

Для установления моносахаридного состава полисахаридных фракций были получены ацетаты полиолов, которые анализировали методом ГЖХ (таблица 2).

Таблица 2 – Моносахаридный состав фракций ПС *S. controversa* DC.

Фракции ПС	Содержание нейтральных полисахаридов, %					
	Rha	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
ФПС <sub>1</sub>	1,65	12,47	2,32	0,67	1,74	21,60
ФПС <sub>2</sub>	0,28	1,87	0,74	1,67	0,83	4,18
ФПВ	0,42	1,87	0,05	-	0,12	0,86

Примечание: «-» моносахарид отсутствует в составе фракции ПС

Проведенное исследование показало что, листья *S. controversa* DC. содержат значительное количество полисахаридов – производных арабиногалактанов.

Результаты эксперимента по лечению травматического остеомиелита (in vivo), выявили терапевтическую активность экстракта листьев *S. controversa* на 40% этаноле (Авдеева Е.Ю. и др., 2019). Таким образом, следующей задачей стало исследование мажорных компонентов данного экстракта.

### 3. Получение, фракционирование и установление компонентного состава экстракта листьев *S. controversa* DC. на 40% этаноле

Из экстракта на 40% этаноле, согласно технологической схеме представленной на рисунке 1, были получены хлороформная (ХЛФ) с выходом 1,36% ± 0,11%, этилацетатная (ЭАФ) (3,20% ± 0,35%), бутанольная фракции (БФ) (8,50% ± 1,02%) и водный остаток (ВО) (86,94% ± 3,17%).

ВЭЖХ анализ ЭАФ показал присутствие 20 соединений (рисунок 2), из которых три со временами удерживания 13,394; 33,928 и 39,766 мин., идентифицированы в сравнении со стандартными образцами как кофейная, салициловая кислоты и кверцетин соответственно.

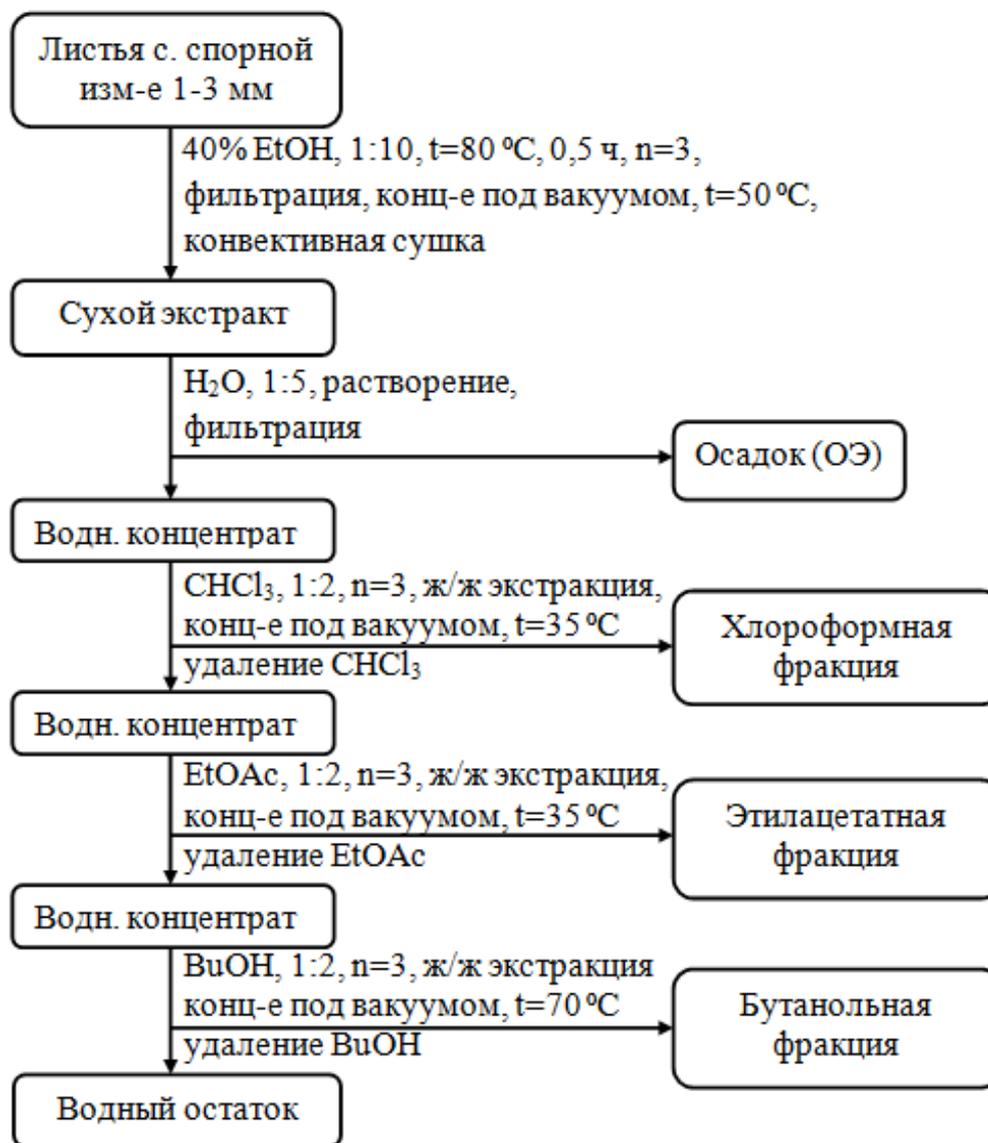


Рисунок 1 – Схема получения и разделения экстракта *S. controversa* DC.

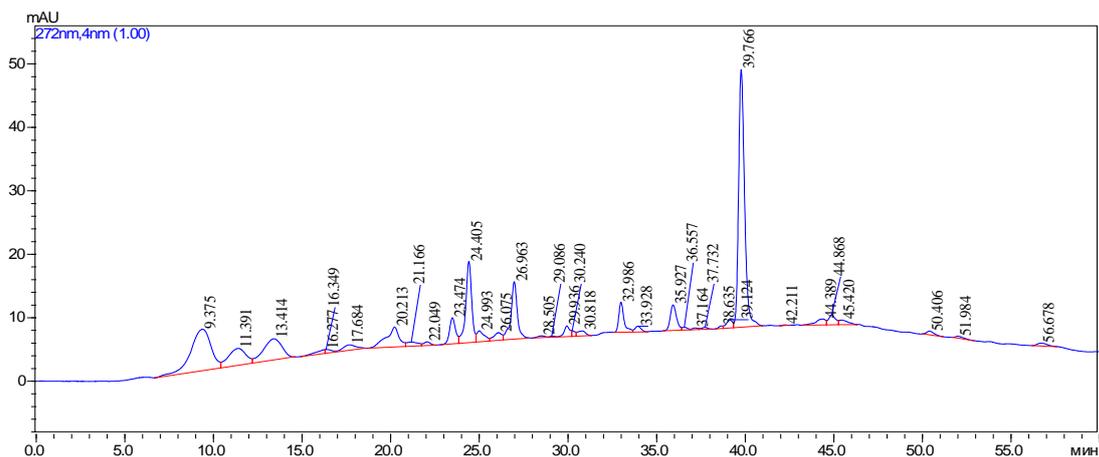


Рисунок 2 – ВЭЖХ-грамма ЭАФ экстракта *S. controversa* DC.

В результате исследования БФ обнаружено присутствие 31 соединения (рисунок 3). Из них 3 вещества со временами удерживания 6,839; 8,133 и 21,061 мин., идентифицированы как сирингин, хлорогеновая кислота и дигидрокверцетин соответственно.

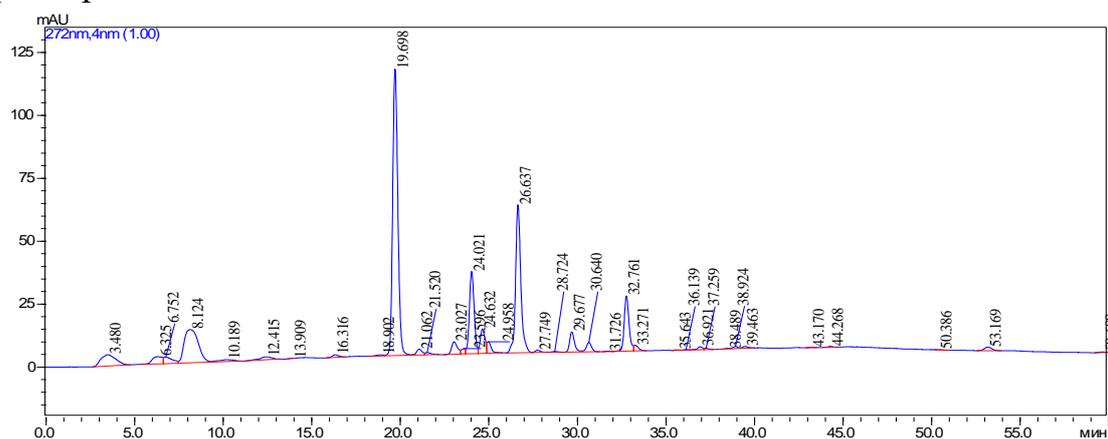


Рисунок 3 – ВЭЖХ-грамма БФ экстракта *S. controversa* DC.

ВЭЖХ водного остатка выявил присутствие 30 соединений, из которых идентифицированы сирингин и хлорогеновая кислота (рисунок 4).

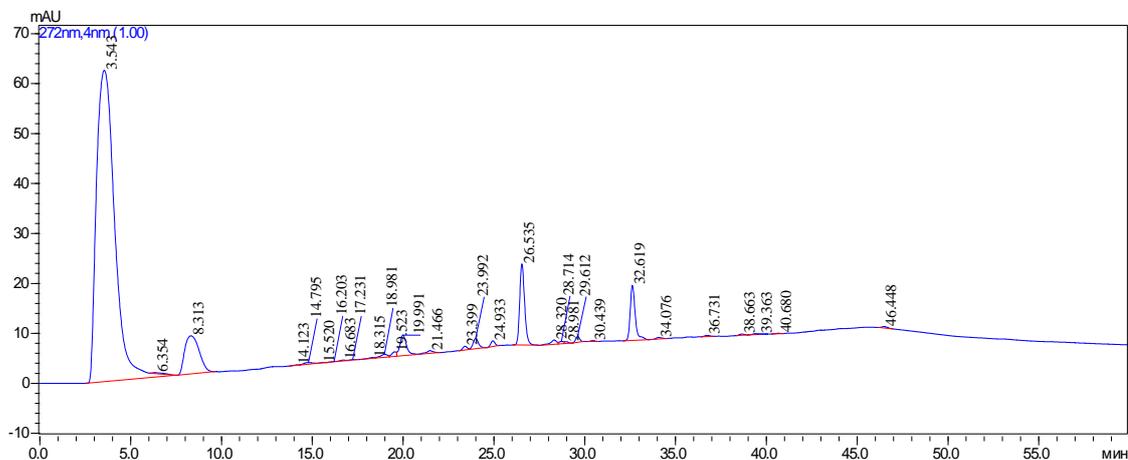


Рисунок 4 – ВЭЖХ-грамма ВО экстракта *S. controversa* DC.

В связи с высоким технологическим выходом и многокомпонентным составом БФ и ВО являются перспективными для последующего углубленного химического анализа с выделением индивидуальных веществ и установлением их структуры.

### Исследование бутанольной фракции экстракта

Бутанольную фракцию, полученную из этанольного экстракта упаривали под вакуумом при температуре 35 °С, до полного удаления бутанола, остаток отстаивали 6 ч, получая при этом гетерогенную смесь состоящую из осадка (ОБФ) и надосадочной жидкости. Осадок переносили на стеклянный фильтр и высушивали (ОБФ). 1,5 г ОБФ вносили в колонку с силикагелем и элюировали смесью этилацетат – этанол с увеличением концентрации последнего от 5 до 80%. В результате были выделены три соединения:

БФ-1 – светло-желтый аморфный порошок (0,080 г), т. пл. 188-190 °С. УФ-спектр (MeOH),  $\lambda_{\max}$ , нм: 290, 355.  $[\alpha]_D^{20} + 48^\circ$  (с 0,28, EtOH).

БФ-2 – светло-желтый аморфный порошок (0,468 г), т. пл. 175-176 °С. УФ-спектр (MeOH),  $\lambda_{\max}$ , нм: 292, 357,  $[\alpha]_D^{20} + 66^\circ$  (с 0,42, EtOH). Элементный анализ: С - 50,66; Н - 5,05; О - 44,29. Рассчитанная молекулярная масса для  $C_{33}H_{40}O_{18}$  составила 724 г/моль.

БФ-3 – светло-желтый аморфный порошок (0,570 г), т. пл. 181-182 °С. УФ-спектр (MeOH),  $\lambda_{\max}$ , нм: 257, 360.

Гидролиз веществ (1%  $H_2SO_4$ ), с последующей с идентификаций ТСХ, показал присутствие кверцетина, глюкозы и рамнозы. На основании ЯМР  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 600 МГц) и ЯМР  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 150 МГц) спектров, вещества идентифицированы как: кверцетин-7-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид (БФ-1), кверцетин-3-О- $\beta$ -D-диглюкопиранозил-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид (БФ-2), кверцетин-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид (рутин, БФ-3). Структурные формулы соединений представлены на рисунке 5.

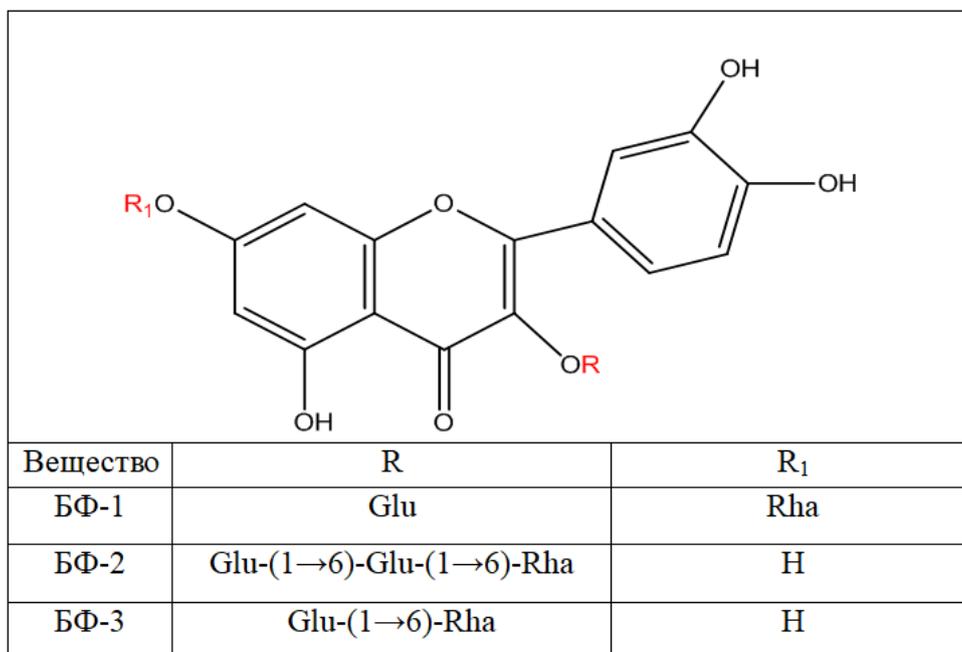


Рисунок 5 – Структурные формулы веществ БФ-1, БФ-2 и БФ-3.

### Исследование водного остатка экстракта

Водный остаток исследовали по схеме, представленной на рисунке 6.

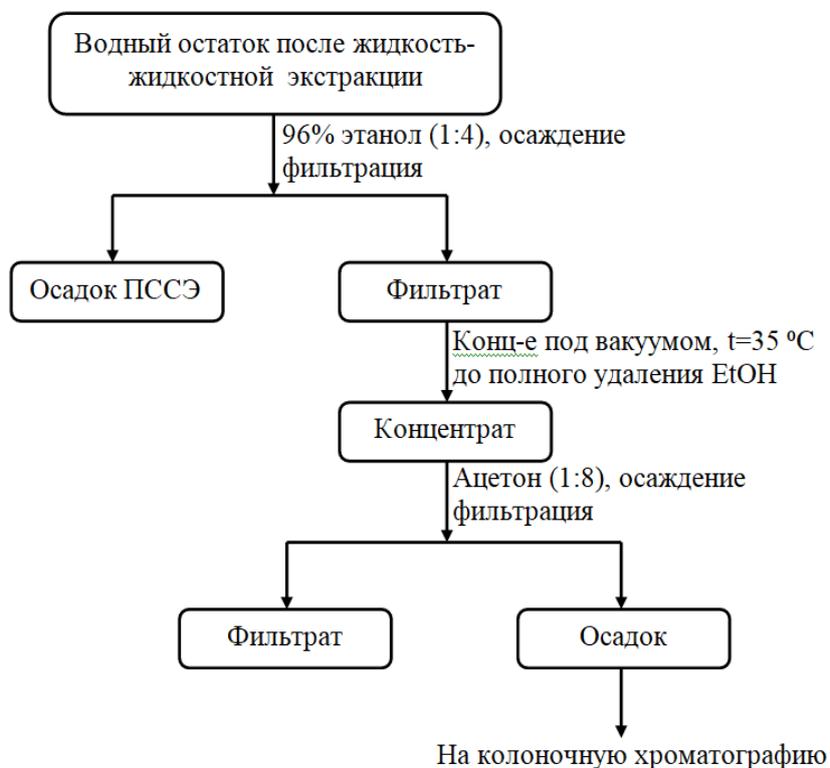


Рисунок 6 – Схема разделения водного остатка экстракта *S. controversa* DC.

В результате хроматографического разделения осадка выделили белое аморфное вещество (180 мг, 45 мг/г экстракта). Характеристики вещества: Т.пл.

265°C, УФ спектр (EtOH),  $\lambda$  272 нм; ИК – спектр (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3437 (ОН), 3067 ( $\text{CH}_2$ ), 1702 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 1642 ( $-\text{C}=\text{C}-$ ), 1405, 1361(ОН), 1123 ( $\text{C}-\text{O}$ ), 960, 914, 883, 812, 796, 730, 618, 539, 465; ЯМР  $^1\text{H}$  (600 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  7.02 м.д. (2 Н, с); ЯМР  $^{13}\text{C}$  (150 МГц,  $\text{DMCO-d}_6$ ),  $\delta$  180,0 м.д. ( $\text{CO}$ ), 152,9; 118,2 ( $\text{C}=\text{C}$ ), 160,2 ( $\text{COOH}$ ); Масс-спектр  $m/z$ : 184 ( $\text{M}^+$ ), 139, 69; рассчитано для  $\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_6$  (184,07): С 45,67; Н 2,19; найдено: С 45,65; Н 2,17. Вещество идентифицировано как 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновая кислота (хелидоновая кислота, рисунок 7).

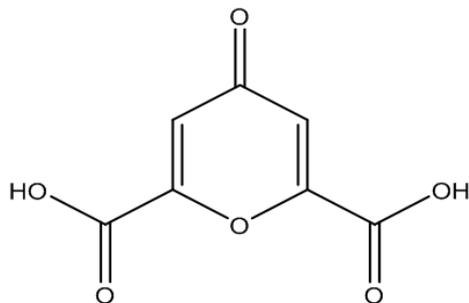


Рисунок 7 – Структурная формула хелидоновой кислоты.

Для полисахаридов, полученных из водного остатка экстракта (ПССЭ) определяли содержание белка, уроновых кислот, молекулярно-массовое распределение и мономерный состав. Содержание белка в ПССЭ составило  $16,15 \pm 0,48\%$ , уроновых кислот –  $6,71 \pm 0,25\%$ . Средневесовая молекулярная масса ( $M_w$ ) ПССЭ составила 108,6, а среднечисленная молекулярная масса ( $M_n$ ) – 5,5 кДа. ПССЭ характеризуются высокой степенью гетерогенности, индекс гетерогенности составил 19,74. Доминирующими монозами ПССЭ, являются галактоза (40,53%) и арабиноза (13,16%). Остатки ксилозы (8,95%), глюкозы (8,55%), маннозы (3,65%) и рамнозы (2,16%) являются второстепенными компонентами углеводных цепей ПССЭ. Таким образом, ПССЭ является арабиногалактаном с  $M_w$  108,6 кДа и сложным мономерным составом.

Выделенные БАВ подвергли исследованию на остеогенную и иммуностимулирующую активность.

#### 4. Исследование биологической активности экстракта *S. controversa* DC. и его компонентов

При изучении острой токсичности результаты токсикометрии и данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 14 дней после введения препарата в дозах 2000, 5000 и 10000 мг/кг, а также данные некропсии, позволяют отнести сухой экстракт сосюреи спорной на 40% этаноле к малотоксичным веществам по классификации Ходжа и Стернера. Руководствуясь принятым ГОСТом (12.1.007-76), исследуемый экстракт относится к IV классу опасности – вещества малоопасные.

Исследованию на остеогенную активность подвергли сумму флавоноидов (ОБФ), полисахариды (ПССЭ), а также хелидоновую кислоту, выделенные из экстракта *S. controversa* DC. на 40% этаноле.

Сравнительную остеогенную активность оценивали, рассчитывая общую площадь участков кальцификации клеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека (ММСК). Площади кальцификации клеточной культуры составили 2,581 мм<sup>2</sup> для хелидоновой кислоты; 4,368 мм<sup>2</sup> для суммы флавоноидов (ОБФ); 4,901 мм<sup>2</sup> для суммы полисахаридов (ПССЭ) (рисунок 8).

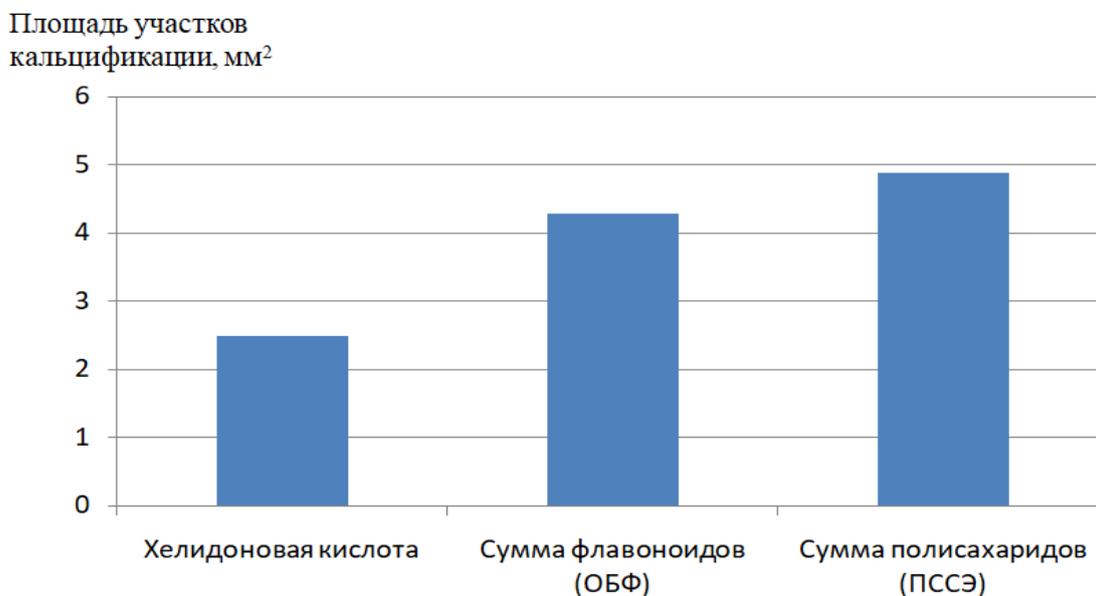


Рисунок 8 – Остеогенная активность мажорных компонентов *S. controversa* DC. в дозе 30 мг/л.

Соответственно, степень влияния объектов на дифференцировку ММСК в остеобласты формирует следующий ряд активности: хелидоновая кислота < сумма флавоноидов (ОБФ) < сумма полисахаридов (ПССЭ). Из этого следует, что хелидоновая кислота, флавоноиды и ПССЭ являются перспективными агентами для ускорения регенерации костной ткани.

Результаты исследования NO-синтазной активности позволили сформировать ряд убывающей активности БАВ: ПССЭ > хелидоновая кислота > кверцетин-7-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозид > кверцетин-3-О-β-D-диглюкопиранозил-О-α-L-рамнопиранозид > рутин (таблица 3).

Таблица 3 – NO-синтазная активность БАВ экстракта *S. controversa* DC.

Исследуемое вещество	Концентрация нитритов (мкМ)
Контроль 1 (макрофаги + среда)	2,00 ± 0,05
ЛПС (0,1 мкг/мл)	18,97 ± 0,62*
МДП (30 мкг/мл)	3,27 ± 0,15* <sup>■</sup>
Кверцетин-7-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозид (БФ-1) (20 мкг/мл)	3,23 ± 0,26 <sup>■</sup>
Кверцетин-3-О-β-D-диглюкопиранозил-О-α-L-рамнопиранозид (БФ-2) (20 мкг/мл)	2,64 ± 1,12 <sup>■</sup>

Кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозил-О-α-L-рамно-пиранозид (БФ-3) (20 мкг/мл)	2,60 ± 0,10 <sup>■</sup>
Хелидоновая кислота(20 мкг/мл)	8,17 ± 0,26* <sup>■</sup>
Полисахариды из экстракта на 40% этаноле (ПССЭ) (20 мкг/мл)	15,76 ± 0,43* <sup>■</sup>

Примечание. \*– различия показателя с контролем 1 достоверны,  $p < 0,05$

<sup>■</sup> – различия показателя с ЛПС достоверны,  $p < 0,05$ ;  $n = 5$

Таким образом, на основании исследования химического состава и биологической активности, целевыми БАВ экстракта листьев *S. controversa* на 40% этаноле являются полисахариды – производные арабиногалактана, флавоноиды – гликозиды кверцетина и хелидоновая кислота.

### 5. Разработка методик стандартизации листьев *S. controversa* DC. Морфолого-анатомическое исследование.

К микродиагностическим признакам листьев *S. controversa* DC. относятся: аномоцитный тип устьичного аппарата (рисунок 9); устьичный индекс  $25,8 \pm 0,6\%$ ; волоски, расположенные на нижнем эпидермисе: 2-3 клеточные головчатые волоски (рисунок 10); 2-3 клеточные бичевидные волоски, состоящие из двух небольших клеток бочонковидной или пьедестальной формы в основании и основной длинной клетки (рисунок 11); 4-клеточные волоски с тремя округлыми бочонковидными клетками в основании и одной верхушечной длинной бичевидной клетки (рисунок 12); 5-7 коллатеральных пучков в центральной жилке (рисунок 13); 10-14 коллатеральных пучков и уголкового колленхима в черешке (рисунок 14).



Рисунок 9 – Нижний эпидермис, ув.х 60: 1 – устьице, 2 – околоустьичные клетки.



Рисунок 10 – Нижний эпидермис, ув.х 100: 1 – трехклеточный головчатый волосок, 2 – устьице.

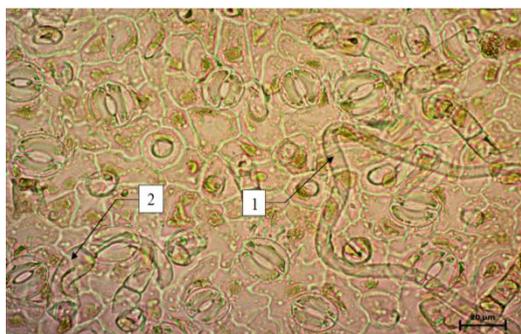


Рисунок 11 – Нижний эпидермис, ув.х 40: 1 – трехклеточный бичевидный волосок, 2 – пьедестальная клетка в основании бичевидного волоска.

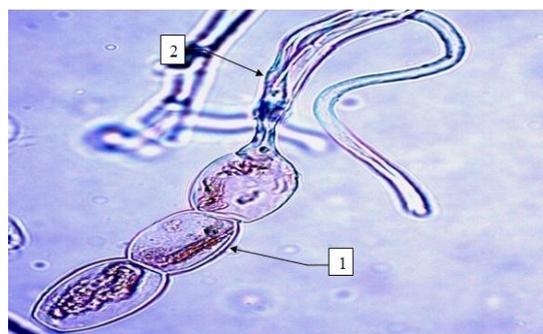


Рисунок 12 – Препарат волоска, ув.х 40: 1 – округлые бочонковидные клетки, 2 – бичевидная клетка.

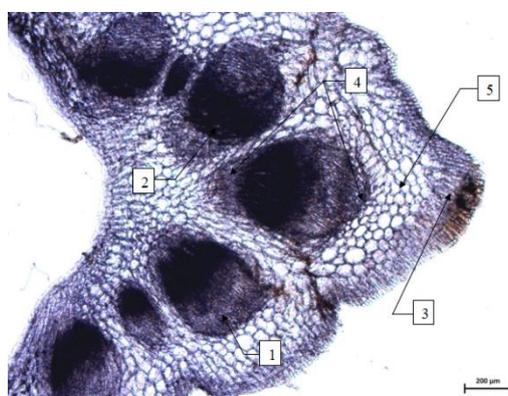


Рисунок 13– Поперечный срез центральной жилки листа (ув. х10): 1 – ксилема, 2 – флоэма, 3 – колленхима, 4 – склеренхима, 5 – паренхима.



Рисунок 14 – Поперечный срез черешка листа (ув. х10): 1 – ксилема, 2 – флоэма, 3 – паренхима, 4 – колленхима, 5 – склеренхима.

### **Разработка и валидация методик качественного и количественного определения целевых БАВ в листьях *S. controversa* DC.**

Установлено, что оптимальными условиями получения аналита являются: трехкратная экстракция листьев *S. controversa* DC., измельченных до 3-6 мм в соотношении 1:15 при 80 °С в течение 60 мин. В разработанном анализе качественно определяли флавоноиды по реакции с раствором алюминия

хлорида, полисахариды – по реакции осаждения 4-х кратным объемом 95% этанола, хелидоновую кислоту – методом ВЭЖХ по времени удерживания. Количественный анализ флавоноидов выполняли спектрофотометрическим методом в пересчете на рутин, полисахаридов – гравиметрическим методом, хелидоновой кислоты методом ВЭЖХ. Все методики количественного определения валидированы по показателям: специфичность, линейность, повторяемость, воспроизводимость, правильность и являются валидными.

Проведено сравнительное исследование содержания целевых БАВ в листьях и стеблях *S. controversa* DC. Выявлено что среднее содержание БАВ в листьях (флавоноиды -  $1,51 \pm 0,19$  %; хелидоновая кислота -  $4,67 \pm 0,52$  %; полисахариды -  $5,88 \pm 1,24$  %), превышает таковое в стеблях (флавоноиды -  $0,58 \pm 0,15$  %; хелидоновая кислота -  $1,13 \pm 0,22$  %; полисахариды -  $2,24 \pm 0,36$  %). Изучено содержание БАВ в листьях *S. controversa* DC. в разные фазы вегетации. Установлено отсутствие значимой разницы в содержании БАВ у виргинильных, имматурных и генеративных особей. Таким образом, рациональна заготовка, как розеточных, так и стеблевых листьев.

Разработаны числовые показатели для стандартизации листьев *S. controversa* DC.: Частей сырья, утративших окраску (почерневшие, пожелтевшие) – не более 4,0%, частей других не ядовитых растений – не более 1,5%, минеральной примеси не более 1,0%, потеря в массе при высушивании – не более 8,5%, золы общей – не более 14,0%, золы нерастворимой в 10%-м растворе хлористоводородной кислоты – не более 0,3%, суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,8%, суммы полисахаридов – не менее 4,0%, хелидоновой кислоты – не менее 3,0%.

Таким образом, в результате фармакогностического исследования сырья (листьев *S. controversa* DC.) определены нормы качества для его стандартизации и разработки проекта ФС «Сосюреи спорной листья».

## ВЫВОДЫ

1. Согласно анализу литературных данных, *S. controversa* DC. является перспективным объектом для исследования фармакологического воздействия на ключевые патогенетические звенья остеомиелита, выявления целевых групп БАВ, ответственных за биологическую активность, их стандартизации для разработки и внедрения НД в фармацевтическую практику.

2. Листья *S. controversa* DC. содержат сесквитерпеновые лактоны, сапонины, дубильные вещества, кумарины, флавоноиды (1,20% ± 0,05%), фенолкарбоновые кислоты (4,46% ± 0,76%), эфирное масло (0,51% ± 0,07%), полисахариды, аминокислоты, макро- и микроэлементы.

3. Хроматографическими методами (БХ, ТСХ, ВЭЖХ) впервые для данного вида идентифицированы фенолкарбоновые кислоты (коричная, кофейная, хлорогеновая, галловая, хинная, салициловая), аминокислоты (валин, аргинин, треонин, лизин, глицин), флавоноиды (кверцетин, рутин, кемпферол, дигидрокверцетин), кумарины (умбеллиферон, эскулетин), тритерпеновые сапонины (олеаноловая и урсоловая кислоты).

4. Полисахаридные комплексы водного извлечения и экстракта на 40% этаноле *S. controversa* DC. охарактеризованы по молекулярно-массовому распределению, содержанию белка, количественному соотношению и мономерному составу нейтральных и кислых сахаров. Технологический выход фракций ПС составил: ФПС<sub>1</sub> (1,93% ± 0,35%); ФПС<sub>2</sub> (0,74% ± 0,16%); ФПВ (10,52% ± 1,58%) и из экстракта на 40% этаноле: ПССЭ (6,15 ± 0,62%). Основными структурными мономерами ФПС<sub>1</sub>, ФПС<sub>2</sub> и ПССЭ являются галактоза и арабиноза, а ∑ПВ – уроновые кислоты.

5. В результате проведенных исследований установлены целевые БАВ экстракта *S. controversa* DC.: полисахариды, гликозиды кверцетина (7-О-α-L-рамнозид-3-О-β-D-глюкозид кверцетина, 3-О-β-D-диглюкозид-О-α-L-рамнозид кверцетина, рутин), хелидоновая кислота, перспективные для дальнейшего изучения их биологической активности.

6. Экстракт на 40% этаноле *S. controversa* DC. согласно ГОСТ (12.1.007-76) относится к IV классу опасности – «Вещества малоопасные». Все целевые БАВ экстракта на 40% этаноле *S. controversa* DC. проявляют в эксперименте статистически достоверную остеогенную активность, стимулируя дифференцировку ММСК в остеобласты, в ряду: хелидоновая кислота < гликозиды кверцетина < полисахариды. По величине стимулирования NO-синтазной активности макрофагов целевые БАВ формируют следующий ряд: рутин < кверцетин-3-О-β-D-диглюкопиранозил-О-α-L-рамнопиранозид < кверцетин-7-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозид < хелидоновая кислота < полисахариды.

7. Выявлены основные макро- и микродиагностические признаки, необходимые для идентификации сырья; разработаны и валидированы методики количественного определения целевых групп БАВ (флавоноиды, полисахариды, хелидоновая кислота); определены нормы качества на сырье и разработан проект ФС – «Соссюреи спорной листья».

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПРЕДСТАВЛЕНО В РАБОТАХ:

1. Авдеева, Е.Ю. Компонентный состав фенольных соединений 7 видов *Saussurea* / Е.Ю. Авдеева, Л.Н. Зибарева, Е.А. Кастерова, **Я.Е. Решетов**, М.Н. Шурупова, М.В. Белоусов // **Химия растительного сырья**. – 2018. – №4. – С.197-204.
2. **Решетов, Я.Е.** Сравнительное исследование элементного состава и биологически активных веществ растений рода *Saussurea* / Я.Е. Решетов, М.В. Белоусов, Е.Ю. Авдеева, М.Н. Шурупова // **Химия растительного сырья**. – 2018. – №4. – С.205-214.
3. **Решетов, Я.Е.** Полисахариды трех видов *Saussurea* DC (*S.controversa*, *S. salicifolia*, *S. frolovii*): выделение, характеристика и влияние на NO – продуцирующие свойства макрофагов / Я.Е. Решетов, А.А. Лигачева, Е.Ю. Авдеева, М.Г. Данилец, В.В. Головченко, Е.С. Трофимова, Е.И. Гулина, Е.Ю. Шерстобоев, А.М. Гурьев, К.И. Ровкина, С.В. Кривошеков, М.В. Белоусов // **Химия растительного сырья**. – 2019. – №4. – С.77-85.
4. Shurupova, M.N. Population structure, resource potential and diagnostic features of raw materials of *Saussurea controversa* DC. / M.N. Shurupova, E.P. Parshina, **Ya.E. Reshetov**, A.A. Krasnobaeva, E.Yu. Avdeeva, M.V. Belousov // **Вестник Томского государственного университета. Биология**. – 2019. – №45. – С.34-46.
5. Лигачева, А.А. Влияние способа получения на состав полисахаридов *Saussurea controversa* DC и их NO- стимулирующую активность / А.А. Лигачева, **Я.Е. Решетов**, Е.Ю. Авдеева, М.Г. Данилец, Е.С. Трофимова, Е.Ю. Шерстобоев, М.В. Белоусов // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2019. – №7. – С.32-37.
6. Авдеева, Е.Ю. Эффективность экстрактов *Saussurea controversa* и *Filipendula ulmaria* на фоне антибиотикотерапии остеомиелита в эксперименте / Е.Ю. Авдеева, М.Г. Скороходова, Е.Д. Порохова, Г.В. Слизовский, Л.С. Муштоватова, С.Д. Иванов, **Я.Е. Решетов**, М.В. Белоусов // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2019. – №12. – С.41-46.
7. Авдеева, Е.Ю. Сравнительная оценка остеогенной активности и влияния на гемопоэтическую функцию красного костного мозга фракций экстрактов *Saussurea controversa* и *Filipendula ulmaria* при экспериментальном остеомиелите / Е.Ю. Авдеева, М.Г. Скороходова, И.В. Суходоло, Е.Д. Порохова, Г.В. Слизовский, Л.С. Муштоватова, **Я.Е. Решетов**, С.Д. Иванов, М.В. Белоусов // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2019. – №3. – С.6-14.
8. Авдеева, Е.Ю. Выбор оптимальной технологии экстракта *Saussurea* спорной стимулирующего гемопоэтическую функцию костного мозга, обладающего остеогенной и иммуностропной активностью / Е.Ю. Авдеева, **Я.Е. Решетов**, Е.И. Гулина, М.В. Белоусов // **Традиционная медицина**. – 2019. – №3(58). – С.40-44.

9. Авдеева, Е.Ю. Острая токсичность сухого экстракта *Saussurea* спорной / Е.Ю. Авдеева, **Я.Е. Решетов**, Е.И. Гулина, А.Г. Мирошниченко, М.В. Белоусов // **Традиционная медицина**. – 2019. – №4(59). – С.38-40.

10. Пат. 2673537 РФ. Средство для стимуляции клеток гранулоцитарного и лимфоидного ряда в костном мозге и регенерации костной ткани и способ его получения / Е.Ю. Авдеева, М.Г. Скороходова, **Я.Е. Решетов**, И.В. Суходоло, Е.Д. Порохова. – № 2017117742; заявл. 22.05.2017; опубл. 22.11. 2018.

11. Avdeeva, E. Flavonol glycosides from *Saussurea controversa* and their efficiency in experimental osteomyelitis / E. Avdeeva, E. Shults, M. Skorokhodova, **Ya. Reshetov**, E. Porokhova, I. Sukhodolo, E. Krasnov, M. Belousov // **Planta Medica International Open**. – 2018. – №5.– P. e24-e29.

12. Khlusov, I. Comparative in vitro evaluation of antibacterial and osteogenic activity of polysaccharide and flavonoid fractions isolated from the leaves of *Saussurea controversa* / I. Khlusov, M. Belousov, E. Porokhova, I. Sukhodolo, E. Avdeeva, **Y. Reshetov**, A. Guryev, V. Shupletsova, O. Khaziakhmatova, L. Litvinova, I. Zvereva, L. Mushtovatova, M. Karpova // **Molecules**. – 2019. – №20. – P. 1-15.

13. Avdeeva, E. Chelidonic acid and its derivatives from *Saussurea controversa*: isolation, structural elucidation and influence on the osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells in vitro / E. Avdeeva, E. Shults, T. Rybalova, **Ya. Reshetov**, E. Porokhova, I. Sukhodolo, L. Litvinova, V. Shupletsova, O. Khaziakhmatova, I. Khlusov, A. Guriev, M. Belousov // **Biomolecules**. – 2019. – №189. – P. 1-12.

14. Решетов, Я.Е. Спектрофотометрическое определение полисахаридов в растениях рода *Saussurea* DC. / Я.Е. Решетов, Е.Ю. Авдеева, М.Н. Шурупова // Материалы всероссийской IV научно-практической конференции «Молодые учёные и фармация XXI века». – 2016. – С. 306-309.

15. Avdeeva, E.Yu. Study element-organic fraction of *Saussurea controversa* DC extract / E. Yu. Avdeeva, E.A. Krasnov, E.E. Shults, Y.E. Reshetov // Труды научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы химии природных соединений». – 2017. – С. 355.

16. Авдеева, Е.Ю. Перспективы использования фитопрепаратов в комплексной терапии остеомиелита / Е.Ю. Авдеева, Я.Е. Решетов, М.В. Белоусов // Материалы конгресса «Человек и лекарство». – 2017. – С. 89.

17. Решетов, Я.Е. Фенольные соединения некоторых сибирских видов *Saussurea* / Я.Е. Решетов, М.Н. Шурупова, У.С. Пиримкулова // Сборник научных трудов XIV международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук. – 2017. – С.136.

18. Avdeeva E., Chemical analysis of bioactive substances in seven siberian *Saussurea* species / E. Avdeeva, Ya. Reshetov, M. Shurupova, L. Zibareva, E. Borisova, M. Belousov // AIP Conference Proceedings. – 2017. – P. 050001-1-050001-7.

19. Авдеева, Е.Ю. Регенераторная активность флавоноидов *Saussurea controversa* при экспериментальном остеомиелите / Е.Ю. Авдеева, Я.Е. Решетов, М.В. Белоусов // Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума по фенольным соединениям. – 2018. – С.405-408.

Решетов Ярослав Евгеньевич (Россия)

***Saussurea controversa* (Saussurea controversa DC.) – перспективный источник средства для лечения остеомиелита**

Проведено фитохимическое исследование листьев *S. controversa* DC. Выделены целевые группы БАВ: полисахариды, флавоноиды, хелидоновая кислота. Изучен состав полисахаридных фракций из водного извлечения и из экстракта на 40% этаноле. Исследована острая токсичность *in vivo*, остеогенная и иммуностропная активность *in vitro*. Выявлены основные диагностические признаки сырья. Определены показатели качества сырья, разработан проект фармакопейной статьи. Разработаны и валидированы методики количественного определения для флавоноидов, спектрофотометрическим методом, полисахаридов методом гравиметрии, хелидоновой кислоты методом ВЭЖХ.

Reshetov Yaroslav Evgenievich (Russia)

***Saussurea controversa* (Saussurea controversa DC.) as a promising source of treatment for osteomyelitis**

A phytochemical study of the leaves of *S. controversa* DC. was performed. Target groups of BAS were identified: polysaccharides, flavonoids, and chelidonic acid. The composition of polysaccharide fractions from water extraction and from 40% ethanol extract was studied. Acute toxicity *in vivo*, osteogenic and immunotropic activity *in vitro* were studied. The main diagnostic features of raw materials are revealed. The quality indicators of raw materials were determined, and a draft pharmacopoeial article was developed. Methods of quantitative determination for flavonoids, spectrophotometric method, polysaccharides by gravimetry, and chelidonic acid by HPLC were developed and validated.