

На правах рукописи

Скрябина Евгения Николаевна

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МАРЬЯННИКА ЛЕСНОГО
И МАРЬЯННИКА ЛУГОВОГО**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2018

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Галишевская Елена Евгеньевна – кандидат фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Клен Елена Эдмундовна – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, профессор кафедры;

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

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск.

Защита состоится «28» ноября 2018 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 по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2. 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 « » _____ 201_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук,

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Одной из актуальных проблем современной фармацевтической науки является поиск новых эффективных лекарственных препаратов для лечения сердечно-сосудистых патологий и заболеваний нервной системы. Настоящие заболевания часто протекают в хронической форме и являются причиной смерти. Нередко при лечении хронических форм заболеваний требуется длительный прием лекарственных средств. В таком случае важную роль играют фитопрепараты, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с синтетическими, а именно мягкость действия, малая токсичность, редкая частота возникновения аллергических реакций. Важным аспектом при этом является поиск и внедрение в научную медицину новых видов лекарственного растительного сырья и препаратов на их основе.

Источниками для поиска новых лекарственных растений являются растения народной медицины, а также близкие по систематическому ряду. С этой точки зрения, особый интерес представляют растения семейства Норичниковые (*Scrophulariaceae*), обладающие многосторонней биологической активностью и применяемые при лечении различных заболеваний, в том числе и патологий сердечно-сосудистой системы, такие как растения рода Наперстянка (*Digitalis*), вероника лекарственная (*Veronica officinalis* L.), коровяк скипетровидный (*Verbascum densiflorum* Bertol.) (Никонов Г. К., 2005). Для марьянника лугового (*Melampyrum pratense* L.), одного из представителей данного семейства, ранее было доказано наличие гипотензивной, противосудорожной, антикоагулянтной активности (Галишевская Е.Е., 2004). Марьянник лесной (*Melampyrum sylvaticum* L.) является близким морфологическим видом к марьяннику луговому. Оба марьянника применяются в народной медицине при лечении сердечно-сосудистых патологий и заболеваний нервной системы. При этом низкая изученность марьянника лесного не позволяет ввести его в научную медицину. В связи с этим является актуальным комплексное изучение сырья марьянника лесного, а также лекарственных средств на его основе.

Степень разработанности. На сегодняшний день растения рода Марьянник широко применяют в народной медицине многих стран при лечении заболеваний нервной системы, сердечно-сосудистых патологий и ряда других заболеваний (Tennant D.J., 2008, Masuya H. и др., 2005, Стрижов А.Н., 2007, Растительные ресурсы СССР, 1990). В нашей стране широко изучали марьянник луговой и марьянник гребенчатый в 60-70-х годах XX-века в Башкирском медицинском институте (Каримова С.Г., 1961, 1968, 1974, 1983, Каримова С.Г., Лазарева Д.Н., 1971, Лазарева Д.Н., Зарудий Ф.С., 1961), в 2000-х годах – марьянник луговой в Пермской фармацевтической академии (Галишевская Е.Е., 2004). Было установлено наличие противосудорожной, седативной, противомикробной, антиагрегационной активности, а также положительное влияние марьянников при лечении сердечно-сосудистых патологий. Доказана перспективность введения марьянника лугового в научную медицину.

Марьянник лесной, близкий морфологический вид марьянника лугового, является малоизученным, при этом также применяется в народной медицине. Сведений о его морфолого-анатомических особенностях, химическом составе, биологической активности не достаточно для введения марьянника лесного в научную медицину.

Цель и задачи исследования. Целью нашей работы являлось сравнительное комплексное фармакогностическое изучение двух морфологически близких видов, произрастающих на территории России, марьянника лесного и лугового, изучение их биологической активности для введения в научную медицину и получения средства, применяемого при лечении заболеваний нервной и сердечно-сосудистой систем.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Провести ресурсоведческое исследование и дать сравнительную характеристику запасов сырья марьянника лесного и лугового в центре ареала произрастания и в наиболее типичных растительных сообществах.

2. Выявить общие анатомические и анатомодиагностические признаки марьянника лесного и лугового.

3. Изучить в сравнении качественный состав сырья и экстрактов марьянника лесного и лугового.

4. Определить количественное содержание основных групп биологически активных веществ (БАВ) в траве и экстрактах марьянника лесного и лугового.

5. Провести фармакологический скрининг экстрактов марьянника лесного и лугового.

6. Разработать фармакопейную статью (ФС) «Марьянника лесного трава».

Научная новизна работы. Впервые проведены ресурсоведческие исследования марьянника лесного в центре ареала распространения на территории России. Доказана возможность промышленной заготовки марьянника лесного травы.

Впервые проведено анатомическое изучение марьянника лесного, которое позволило выявить анатомодиагностические признаки, позволяющие отличить его от близкородственного вида марьянника лугового.

Проведен фитохимический анализ травы и изучена динамика накопления БАВ по органам марьянника лесного.

Впервые обнаружены флавоноиды в траве и органах марьянника лесного, идентифицированы цинарозид и гиперозид. Впервые проведен качественный и количественный анализ аминокислотного состава марьянников сырья. Установлено наличие глутаминовой кислоты, глицина, фенилаланина, лизина.

Определено количественное содержание флавоноидов в пересчете на цинарозид, иридоидов – в пересчете на аукубин, аминокислот – в пересчете на глутаминовую кислоту.

Изучен микроэлементный состав травы и органов марьянника лесного и состав жирного масла семян.

Исследование качественного и количественного состава основных групп БАВ позволило обосновать использование всей надземной части с корнями марьянника лесного.

Впервые установлено прямое антикоагулянтное действие суммы фенольных соединений, оказывающих влияние на плазменные факторы свертывания.

Доказано наличие седативной и противосудорожной активности, подтверждающие литературные данные об использовании марьянников в народной медицине. Установлено нейромодуляторное антиалкогольное действие экстрактов марьянника лесного.

Изучена острая токсичность экстрактов марьянника лесного травы, определен четвертый класс (вещества малотоксичные) по ГОСТ.

Научная новизна диссертационных исследований подтверждена патентом РФ № 2613312 «Способ получения средства, обладающего седативной, противосудорожной и нейропротекторной антиалкогольной активностью».

Теоретическая и практическая значимость работы. Научно обоснована целесообразность использования травы марьянника лесного наряду с марьянником луговым для получения препаратов антикоагулянтного, седативного, нейромодуляторного антиалкогольного и противосудорожного действия. Для стандартизации травы и экстрактов марьянника лесного обоснован выбор методик количественного определения суммы флавоноидов, иридоидов, аминокислот. Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. На основании данных фитохимического, фармакологического, морфолого-анатомического анализов разработан проект фармакопейной статьи (ФС) «Марьянника лесного трава».

Методология и методы диссертационного исследования. Методология диссертационного исследования построена на изучении и обобщении литературных данных по фармакогностическому изучению и биологической активности растений рода *Melampyrum*, оценке степени разработанности и актуальности темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения всех этапов диссертационной работы; научно обоснован выбор объектов и современных методов исследования.

Объектами исследования являлись трава с корнями однолетних дикорастущих растений марьянника лесного (*Melampyrum sylvaticum* L.) и марьянника лугового (*Melampyrum pratense* L.) семейства Норичниковые (*Scrophulariaceae*), а также сухие спиртовые экстракты, сухие водные экстракты, высокоочищенные фракции флавоноидов и иридоидов марьянников лесного и лугового. В процессе исследования использованы методы цифровой микроскопии, бумажной (БХ), колоночной, газожидкостной хроматографии (ГЖХ), хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), фотоэлектроколориметрии (ФЭК), спектрофотометрии в видимой и УФ-области спектра, атомно-эмиссионной спектрометрии. Также использовались пробирочные реакции, фармакологические методы исследования. Математическая обработка данных проводилась с использованием современных компьютерных технологий.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты ресурсоведческого исследования марьянника лесного и лугового в центре ареала распространения на территории России.
2. Результаты анатомического исследования марьянника лесного.
3. Результаты фитохимического исследования травы и экстрактов марьянника лесного и лугового.
4. Результаты фармакологического скрининга экстрактов марьянника лесного и лугового.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов проведенного исследования основана на экспериментальных данных, полученных с помощью цифровой микроскопии, БХ, ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии в видимой и УФ-области спектра, ФЭК, атомно-эмиссионной спектрометрии, фармакологических тестов. Статистическая обработка данных проводилась в соответствии с государственной фармакопеей XIII Российской Федерации с применением программ Microsoft Office Excel 2007, STAT.

Апробация полученных результатов. Основные положения работы доложены и обобщены на научно-практических конференциях «76 Всероссийская

научная конференция студентов и молодых ученых с международным участием» (Курск, 2011), «Гаммермановские чтения» (Санкт-Петербург, 2011), «Научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Пермской государственной фармацевтической академии» (Пермь, 2011), «Perspektywiczne opracowania są nauką i technikami – 2011» (1, 2011), «Фармакологическая наука – от теории к практике» (Казань, 2015).

Внедрение результатов исследования. Теоретические положения и результаты экспериментальных исследований используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе кафедры фармакогнозии с курсом ботаники Пермской государственной фармацевтической академии. Подготовлен к рассмотрению проект ФС «Марьянника лесного трава». Получен 1 патент РФ на изобретение «Способ получения средства, обладающего седативной, противосудорожной и нейромодуляторной антиалкогольной активностью».

Личный вклад автора. Автор непосредственно участвовал в проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, в апробации результатов исследования, подготовке основных публикаций по выполненной работе, написанию диссертации и автореферата.

Связь темы исследования с планом основных научно-исследовательских работ академии. Работа выполнена в рамках комплексной научной темы кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Номер государственной регистрации – 01.9.10018875

Соответствие паспорту специальности. Работа соответствует специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) по нескольким областям:

1. Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье.
2. 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 по теме диссертации. По материалам исследования опубликовано 14 научных работ, из них 5 в журналах, включенных ВАК Минобрнауки РФ в перечень рецензируемых научных изданий. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, четырех глав, отражающих результаты собственных экспериментальных исследований, заключения, приложения. Работа иллюстрирована 37 таблицами и 46 рисунками. Библиографический указатель включает 133 источника, из них 20 на иностранных языках.

Во введении изложена актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, обозначена новизна и практическая значимость проведенных исследований; описаны положения, выносимые на защиту.

Первая глава содержит аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы: систематическое положение, распространение рода *Melampyrum* L. и видов *Melampyrum sylvaticum* L. и *Melampyrum pratense* L. в Российской Федерации и за рубежом, ботаническое описание; химический состав и биологические свойства основных активных компонентов *Melampyrum sylvaticum* L. и *Melampyrum pratense* L., данные о применении растений рода Марьянник в народной медицине и экспериментальной фармакологии, обоснование перспективности изучения *Melampyrum sylvaticum* L. и *Melampyrum pratense* L. и разработки на их основе фитопрепаратов направленного действия.

Вторая глава включает описание объектов и методов исследования.

В третьей главе приведены результаты ресурсоведческого исследования марьянника лесного в сравнении с марьянником луговым.

В четвертой главе отражены результаты анатомического исследования марьянника лесного.

В пятой главе отражены результаты исследований качественного и количественного состава БАВ травы и экстрактов марьянника лесного и лугового; определения состава фенольных соединений, иридоидов, аминокислот, жирных кислот, микроэлементов.

В шестой главе приведен фармакологический скрининг экстрактов марьянника лесного и лугового.

В приложении представлен проект ФС, акт внедрения полученных результатов, патент РФ на изобретение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектом фармакогностического исследования была собранная в период от начала цветения до начала плодоношения и высушенная трава (надземная часть с корнями) и части растений м. лесного – *M. sylvaticum* L. и м. лугового *M. pratense* L. – сем. Норичниковые (*Scrophulariaceae*). Экстракты получали способом, разработанным для травы м. лугового и защищенным Патентом РФ. Спиртовый экстракт получали методом реперколяции по Босину с законченным циклом с равной загрузкой сырья в батарею из четырех перколяторов. В качестве экстрагента использовали спирт этиловый 50%. Время настаивания шесть часов. Водные экстракты получали путем последовательного экстрагирования на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение двух часов в трехкратной повторности. В качестве экстрагента использовали воду очищенную, соотношение сырье:экстрагент – 1:10. Полученные извлечения объединяли, охлаждали, фильтровали, сгущали и высушивали в роторном выпарном аппарате при температуре реакционной массы $50 \pm 2^\circ\text{C}$ и давлении 0.01 кгс/см^2 (9.81 гПа) до получения сухого остатка. Очищенные фракции флавоноидов и иридоидов получали методом колоночной хроматографии на полиамиде.

Запасы м. лесного определяли способом работы на конкретных зарослях. Плотность запаса сырья определяли методом модельных экземпляров.

Изучение анатомического строения проводили на растениях среднего размера, свежих и зафиксированных в спирте 70% по общепринятым методикам (ГФ XIII).

Качественный состав и количественное содержание БАВ травы и экстрактов исследовали с помощью современных методов и приемов фитохимического анализа: хроматографические методы (ВЭЖХ, ГЖХ, ТСХ, БХ), спектральные методы (спектрофотометрия в видимой и УФ-области спектра, ФЭК, атомно-эмиссионная спектрометрия).

Фармакологические свойства изучали с использованием нелинейных белых мышей массой 17 – 25 г. Оценку острой токсичности экстрактов определяли при внутрижелудочном введении. Противосудорожную активность исследовали в тесте «Коразоловые судороги», седативную активность – в тесте «Открытое поле», нейропротекторную активность – в тесте «Крестообразный лабиринт». Антикоагулянтную активность исследовали *in vitro* с помощью коагулометра «Минилаб 701». Для обработки полученных данных использовали статистический анализ.

Ресурсоведческие исследования м. лесного и м. лугового

Проведена оценка запасов сырья м. лугового и м. лесного в центральной части ареала распространения на территории России.

Было выделено несколько типов растительных сообществ, в которых произрастают исследуемые виды. И м. луговой, и м. лесной произрастают пятнами, плотные заросли образуют на опушках, участках редколесья, вдоль лесных дорог – местах, характеризующихся относительно высокой освещенностью. Процент плотных зарослей от общей площади фитоценоза составляет от 5 до 80%, что учитывали при расчете запасов сырья. Плотность запасов воздушно-сухого сырья м. лугового составляет от 76 до 240 кг/га, м. лесного – от 60 до 184 кг/га. Биологический запас сырья м. лугового в сумме на пяти зарослях варьирует от 3.2 т. до 4 т. воздушно-сухого сырья, м. лесного на трех зарослях – от 1.2 т. до 1.4 т. Эксплуатационный запас м. лугового составляет около 2.9 т., м. лесного – около 1 т. М. луговой образует продуктивные заросли, биологический и эксплуатационный запасы значительны, что свидетельствует о возможности промышленной заготовки травы м. лугового. М. лесной встречается на территории нашей страны реже, чем м. луговой, образует меньшие по площади, но достаточно продуктивные заросли.

Изучение анатомического строения м. лесного

Анатомическое строение м. лесного изучали в сравнении с микродиагностическими признаками м. лугового, изученными ранее. Установлено, что анатомическое строение вегетативных органов м. лесного очень схоже с м. луговым. Общими признаками для анатомии листа являются строение клеток эпидермы, наличие одноклеточных трихом (рис. 1) и шаровидных железок, имеющих короткую ножку и четырехклеточную головку (рис. 2). Стебель м. лесного и м. лугового имеет беспучковый тип проводящей системы с хорошо выраженной древесиной, представленной сосудами и древесинными волокнами, расположенными рядами по радиусу (рис. 3). Главный корень имеет вторичное строение, покрыт тонким слоем пробки, с хорошо развитой ксилемой, образованной большим количеством крупнопросветных сосудов (рис. 4).

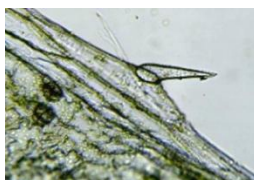


Рис. 1. Простой одноклеточный волосок

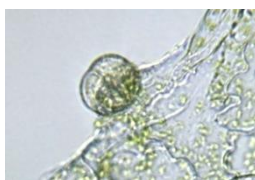


Рис. 2. Железка (вид сбоку)

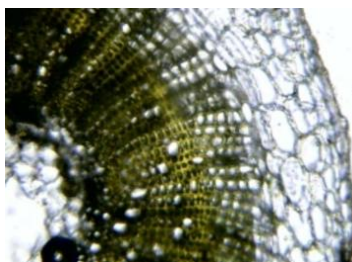


Рис. 3. Фрагмент поперечного среза стебля *M. sylvaticum*

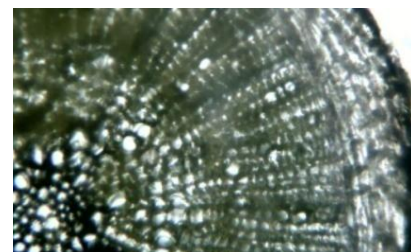


Рис. 4. Фрагмент поперечного среза главного корня *M. sylvaticum*

Отличительными анатомодиагностическими признаками вегетативных органов м. лесного можно считать отсутствие многоклеточных волосков на листьях; хорошо выраженную экзодерму в первичной коре стебля, представленную рыхлой колленхимой.

Химический состав, распределение основных групп БАВ и оценка качества сырья и экстрактов м. лесного и м. лугового

По результатам качественного анализа определены основные группы БАВ травы и экстрактов м. лесного и м. лугового: флавоноиды, иридоиды, аминокислоты.

Анализ фенольных соединений

На основании результатов хроматографического анализа установлен состав и характер распределения флавоноидов по органам в м. лесном. В траве обнаружено не менее 17 веществ флавоноидной природы. По органам фенольные

вещества распределяются неравномерно: в листьях обнаружено 10 флавоноидов и 6 фенолкарбоновых кислот, в цветках и стеблях – 5-6 флавоноидов и 2-3 фенолкарбоновые кислоты, в корнях – 3 флавоноида и 4 фенолкарбоновые кислоты.

При сравнении экстрактов исследуемых видов было установлено, что марьяники имеют близкую картину хроматографического распределения фенольных соединений (рис. 5, рис. 6). В экстрактах обнаружено 12 веществ флавоноидной природы (условные обозначения см. в диссертации).

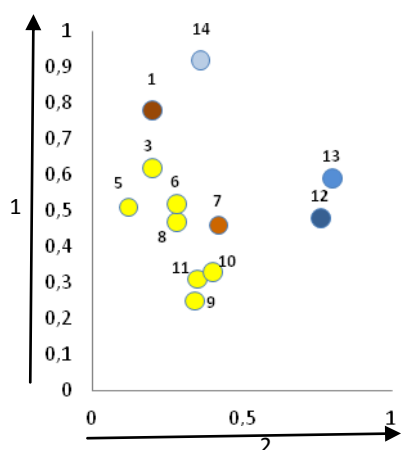


Рис. 5. Схема хроматограммы фенольных соединений спиртового экстракта м. лесного в УФ свете

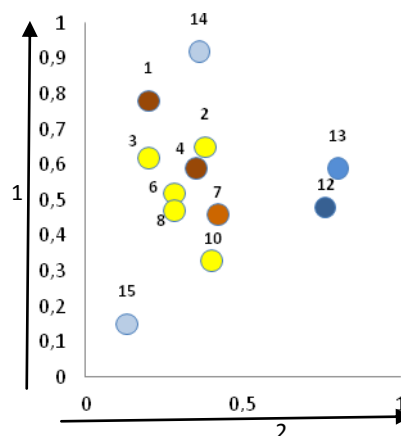


Рис. 6. Схема хроматограммы фенольных соединений спиртового экстракта м. лугового в УФ свете

При исследовании флавоноидов методом ТСХ в экстрактах м. лесного обнаружено от 5 (водный экстракт) до 8 (спиртовой экстракт) веществ флавоноидной природы, в экстрактах м. лугового от 7 до 8 флавоноидов соответственно.

Для более точной идентификации фенольных соединений было проведено исследование методом ВЭЖХ. В результате проведенных исследований в траве и водном экстракте м. лесного было найдено 15 веществ флавоноидной природы, в спиртовом экстракте обнаруживается только 11 веществ. Максимальное количество флавоноидных веществ в м. луговом наблюдается в водном экстракте – 19 соединений, в траве найдено и спиртовом экстракте – 16 и 17 веществ соответственно.

Флавоноиды марьянников – гиперозид и цинарозид – идентифицировали по спектрам поглощения и временам удерживания в сравнении со стандартными образцами (рис. 7).

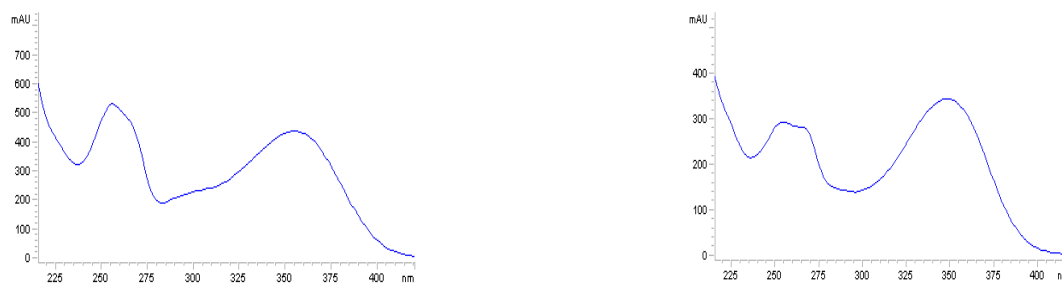


Рис. 7. УФ-спектры поглощения стандартных образцов:

1. Гиперозид, время удерживания – 35.156 мин;
2. Цинарозид, время удерживания – 35.845 мин

Во всех исследуемых образцах было доказано наличие цинарозида и гиперозида. Результаты ВЭЖХ-анализа подтверждают результаты исследований БХ и ТСХ и доказывают большое разнообразие веществ фенольной природы в исследуемых видах.

Определение **количественного содержания** флавоноидов в пересчете на цинарозид проводили методами дифференциальной спектрофотометрии и ВЭЖХ. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Количественное содержание флавоноидов в траве и экстрактах марьянника лесного и лугового

№ п/п	Объект		Содержание цинарозида, %	Сумма флавоноидов в пересчете на цинарозид, %	
				ВЭЖХ	Дифференциальная спектрофотометрия
1	М. лесной	Трава	0.0622	0.3294	0.27
2		Спиртовый экстракт	0.0201	1.9621	2.38
3		Водный экстракт	0.3420	1.1561	2.26
4	М. луговой	Трава	0.0141	0.3493	0.39
5		Спиртовый экстракт	0.0369	5.2237	3.61
6		Водный экстракт	0.0856	6.8875	3.95

Количественный анализ показал, что в траве марьянников содержится около 0.3% флавоноидов, в экстрактах от 2 (м. лесной) до 7% (м. луговой).

Анализ иридоидов

В траве м. лесного было обнаружено не менее пяти соединений иридоидной природы. Обнаруженные соединения по качественным реакциям на

хроматограммах можно объединить в две группы: вещества под номерами 1, 2, 3 принадлежат к иридоидам подгруппы каталпола и изокаталпола; вещества под номерами 4 и 5 – к подгруппе аукубина. Вещество с величиной R_f 0.47 (№4) в сравнении со стандартным образцом предварительно идентифицировано как аукубин. В экстрактах марьянников обнаружено от 3 до 4 веществ иридоидной природы.

Результаты ТСХ - анализа сопоставимы с результатами нисходящей хроматографии: в спиртовых экстрактах обнаружено 4 вещества иридоидной природы, в водных – от 2 до 3 (табл. 2). Вещество № 3 по хроматографическому поведению идентифицировано как аукубин.

Таблица 2

Люминисцентно-хроматографическая характеристика иридоидных соединений экстрактов марьянников в системе изопропанол-вода 4:1

№	R_f	Окраска пятен		М. лесной		М. луговой	
		Реактив Бекона - Эдельмана	Реактив Шталя	Спиртовый экстракт	Водный экстракт	Спиртовый экстракт	Водный экстракт
1	0.51	Коричневый		+	+	+	+
2	0.82	Темно-коричневый	Голубой	+	+	+	+
3	0.87	Коричневый		+		+	+
4	0.90	Светло-коричневый		+		+	
1	0.87	Темно-коричневый	Голубой	Аукубин			

Определение количественного содержания иридоидов в траве и органах м. лесного, а также в экстрактах м. лесного и м. лугового проводили методом фотоэлектроколориметрии в пересчете на аукубин. Содержание иридоидов в траве м. лесного составляет в среднем 0.57%, наибольшее содержание наблюдается в цветках (1.04%), наименьшее – в корнях (0.18%), в листьях и стеблях – 0.52% и 0.42% соответственно. Содержание иридоидов значительно превосходит в экстрактах *M. pratense* по сравнению с экстрактами *M. sylvaticum*. В экстрактах м. лесного содержится около 4% иридоидов, м. лугового – от 6 до 11%.

Аминокислотный состав

В экстрактах из травы м. лесного содержится большее количество аминокислот (не менее 11), чем в экстрактах м. лугового (не менее 8). Идентифицированы орнитин, глутаминовая кислота, пролин, тирозин, валин. Перечисленные аминокислоты содержатся в экстрактах обоих исследуемых видов.

Для тонкослойной хроматографии были выбраны системы подвижной фазы: 1. Пропанол – вода (1:1); 2. Ацетон – вода – ледяная уксусная кислота – муравьиная кислота (50:15:12:3). В первой системе было обнаружено от двух до трех аминокислот, во второй системе – от двух до четырех аминокислот.

Поскольку в исследуемых экстрактах содержится большое количество компонентов аминокислотной природы, и аминокислоты имеют близкую величину R_f , методы БХ и ТСХ могут быть использованы для предварительной оценки качественного состава аминокислот в экспресс-анализе. Для более подробного изучения был использован метод ВЭЖХ. В результате проведенных хроматографических исследований в траве м. лесного было обнаружено 8 аминокислот, среди которых больший удельный вес имеют фенилаланин, глицин, глутаминовая кислота (табл. 3). В наименьших количествах содержатся аланин, изолейцин, пролин. В м. луговом обнаружено 5 аминокислот, преобладают среди них фенилаланин, лизин, валин.

Таблица 3

Количественное содержание аминокислот в м. лесном и м. луговом

№ п/п	Аминокислоты	Концентрация, мг%	
		М. лесной	М. луговой
1	Аспарагиновая кислота	0.202	
2	Глутаминовая кислота	0.248	
3	Глицин	0.963	
4	Аланин	0.024	
5	Пролин	0.016	0.430
6	Изолейцин	0.018	
7	Фенилаланин	0.309	1.412
8	Лизин	0.120	1.268
9	Тирозин		0.002
10	Валин		0.566
	Сумма	1.9	3.678

Определение количественного содержания суммы свободных аминокислот в экстрактах м. лесного проводили методом прямой спектрофотометрии в пересчете на глутаминовую кислоту на основе реакции с нингидрином при длине волны 568 нм. Сумма свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту в спиртовом экстракте м. лесного составила $5.27 \pm 0.05\%$, в водном экстракте – $4.32 \pm 0.12\%$. Значительное повышение процентного содержания

аминокислот в экстрактах свидетельствует, что технология экстрактов способствует увеличению выхода аминокислот.

Фармакологическая активность экстрактов из травы м. лесного и м. лугового

Нами были проведены исследование фармакологической активности и острой токсичности экстрактов м. лесного в сравнении с экстрактами м. лугового.

Изучение антикоагулянтной активности

Нами была изучена антикоагулянтная активность экстрактов м. лесного в сравнении с аналогичными экстрактами м. лугового. Результаты полученного исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4

Влияние спиртовых и водных экстрактов м. лесного и м. лугового на свертываемость крови

Исследуемый объект	Время свертывания, сек		% изменения свертываемости	Р достоверность
	Контроль	Опыт		
Спиртовый экстракт м. лугового	34.5±2.84	35.7±2.08	- 3.5	>0.05
Водный экстракт м. лугового	21.5±0.87	24.6±1.01	- 14.4	<0.05
Спиртовый экстракт м. лесного	45.2±5.10	36.9±3.43	+ 18.4	>0.05
Водный экстракт м. лесного	20.4±0.59	22.6±0.66	- 10.8	<0.05
Гепарин	29.9±0.48	36.6±1.82	- 22.4	<0.01

Примечание: Р – в сравнении с контролем

Для выявления группы БАВ, определяющих антикоагулянтное действие, было исследовано влияние на гемостаз флавоноидов и иридоидов исследуемых видов. По результатам, представленным в таблице 4, видно, что водные экстракты оказали прямое антикоагулянтное действие. Из данных таблицы 5 следует, что флавоноиды м. лесного и м. лугового проявляют прямую антикоагулянтную активность.

Таблица 5

Исследование влияния суммы флавоноидов и суммы иридоидов м. лугового и м. лесного на свертываемость крови

Соединение	Время свертывания, сек		% изменения свертываемости	Р достоверность
	Контроль	Опыт		
Флавоноиды м. лесного	21.9±0.75	25.9±1.40	- 22.8	<0.01
Иридоиды м. лесного	29.2±3.32	30.9±1.84	- 5.6	>0.05
Флавоноиды м. лугового	20.6±0.35	23.9±0.86	- 16.0	<0.01
Иридоиды м. лугового	26.9±0.82	26.2±1.24	+ 1.1	>0.05
Гепарин	29.9±0.48	36.6±1.82	- 22.4	<0.01

Примечание: Р – в сравнении с контролем

С целью изучения механизмов угнетения свертывания под влиянием суммы флавоноидов м. лесного были проведены исследования действия на цельную кровь, тромбоциты и факторы свертывания плазмы (табл. 6). Из результатов следует, что флавоноиды м. лесного уменьшают скорость свертывания цельной крови, плазмы, обогащенной тромбоцитами, и плазмы без тромбоцитов. Тем самым, флавоноиды оказывают влияние на плазменные факторы свертывания.

Таблица 6

Исследование влияния суммы флавоноидов м. лесного на факторы свертывания крови

Субстрат	Время свертывания, сек		% изменения свертываемости	Р достоверность
	Контроль	Опыт		
Цельная кровь	20.5±1.08	28.9±1.87	- 22.8	<0.01
Плазма, обогащенная тромбоцитами	33.5±1.41	40.5±1.01	- 20.9	<0.01
Плазма без тромбоцитов	39.1±2.52	48.4±2.32	- 23.8	<0.01

Изучение противосудорожной активности

Нами была исследована противосудорожная активность экстрактов м. лесного. О противосудорожном действии судили по предупреждению тонической фазы судорог (табл. 7).

Таблица 7

Противосудорожная активность экстрактов м. лесного

Образец	Доза, мг/кг	Латентный период судорог, сек	Продолжительность жизни, сек	Выживаемость, %
Коразол	120	48.4 ± 1.29	209.8 ± 8.92	0
Водный экстракт	100	53.80 ± 1.85*	873.2 ± 13.22*	20
	200	241.5 ± 7.50*	755.5 ± 42.74*	20
Спиртовый экстракт	100	45.3 ± 2.91	450.7 ± 49.87*	0
	200	187.5 ± 7.50*	637.7 ± 14.68*	20

Примечание: * - P<0.05

Установлено, что водный и спиртовый экстракты м. лесного в дозе 100 мг/кг не влияют на латентный период судорог, но достоверно увеличивают продолжительность жизни. Экстракты в дозе 200 мг/кг увеличивают латентный период и продолжительность жизни. Выживаемость животных под влиянием водного экстракта в обеих дозах и спиртового в дозе 200 мг/кг составила 20%.

Полученные результаты свидетельствуют, что м. лесной обладает противосудорожной активностью на фоне действия коразола и воздействует на средний и межуточный мозг.

Изучение седативной активности

Нами была изучена седативная активность экстрактов м. лесного и м. лугового при длительном применении. Активность проверяли с помощью методики «Открытое поле». Фиксировали следующие параметры: горизонтальная двигательная активность, вертикальная двигательная активность и косметическая активность (груминг).

Анализ полученных данных показал, что при длительном применении экстрактов марьянников происходит достоверное снижение вертикальной активности (табл. 8). Угнетение вертикальной активности под влиянием экстрактов марьянников сопоставимо или ниже, чем под влиянием экстракта валерианы. Уменьшение числа «вертикальных стоек» у животных под влиянием экстрактов свидетельствует о наличии у них седативной активности.

Таблица 8

Вертикальная активность на фоне влияния
экстрактов м. лесного и м. лугового и экстракта валерианы

Время эксперимента	Активность	Объект						Экстракт валерианы
		Контроль	М. лесной		М. луговой			
			спиртовый экстракт	водный экстракт	спиртовый экстракт	водный экстракт		
До опыта	С упором	15.3±1.46						
	Без упора	6.7±1.57						
10 дней	С упором	15.1±1.73	12.0±1.27	10.6* [#] ±0.97	13.3±1.08	20.3±2.00	9.7* [#] ±1.46	
	Без упора	6.4±1.73	1.0* [#] ±0.44	1.9* [#] ±0.55	3.6±0.57	5.1±0.74	1.4* [#] ±0.30	
20 дней	С упором	16.0±1.15	5.6* [#] ±1.46	6.6* [#] ±0.90	12.1±1.70	13.1±1.30	7.6* [#] ±0.84	
	Без упора	6.7±1.54	1.1* [#] ±0.63	2.6* [#] ±1.00	3.7±1.28	4.0±0.58	0.6* [#] ±0.30	
30 дней	С упором	15.1±1.87	7.6* [#] ±1.78	7.4* [#] ±1.48	6.3* [#] ±1.08	8.4* [#] ±0.61	11.3* [#] ±0.81	
	Без упора	6.3±1.70	0.3* [#] ±0.18	1.4* [#] ±0.61	2.0* [#] ±0.79	2.7* [#] ±0.68	2.6* [#] ±0.69	

Примечание: * - различия со значением исследуемого показателя в контроле достоверны

- различия со значением исследуемого показателя начала опыта достоверны

Достоверного снижения горизонтальной активности по периферии у подопытных животных не наблюдалось (табл. 9), хотя, выход животных в центр площадки значительно снизился уже после десяти дней приема исследуемых экстрактов и экстракта валерианы. Уменьшение числа выходов в центр площадки говорит об угнетении ориентировочно-исследовательского поведения животных.

После тридцатидневного приема экстрактов марьянников и валерианы наблюдается общее снижение активности. При приеме экстрактов марьянников наблюдается постепенное снижение общей активности, как и в случае приема

экстракта валерианы. На фоне приема экстрактов м. лесного наблюдается максимальное снижение общей двигательной активности.

Таблица 9

Горизонтальная активность на фоне влияния
экстрактов м. лесного и м. лугового и экстракта валерианы

Время эксперимента	Активность	Объект					
		Контроль	М. лесной		М. луговой		Экстракт валерианы
			спиртовый экстракт	водный экстракт	спиртовый экстракт	водный экстракт	
До опыта	Сектор	61.2±5.24					
	Центр	3.5±0.59					
10 дней	Сектор	64.0±6.68	78.6±6.36	60.9±4.17	55.3±2.44	49.4±4.03	51.7±2.65
	Центр	3.6±0.46	1.6* [#] ±0.48	0.4* [#] ±0.20	1.3* [#] ±0.18	1.9* [#] ±0.40	0.1* [#] ±0.14
20 дней	Сектор	60.4±6.45	40.4* [#] ±6.40	50.4±4.10	51.9±3.19	60.4±4.91	45.4* [#] ±1.67
	Центр	3.5±0.68	1.3* [#] ±0.71	1.1* [#] ±0.46	0.9* [#] ±0.34	1.3* [#] ±0.29	0.7* [#] ±0.36
30 дней	Сектор	62.7±6.89	37.4* [#] ±5.82	40.9* [#] ±3.65	49.3±5.54	51.0±3.09	58.9±3.49
	Центр	3.6±0.61	0.4* [#] ±0.30	1.3* [#] ±0.29	1.6* [#] ±0.37	0.4* [#] ±0.20	0.7* [#] ±0.18

Примечание: * - различия со значением исследуемого показателя в контроле достоверны
- различия со значением исследуемого показателя начала опыта достоверны

Действие марьянников и экстракта валерианы на косметическую активность (груминг) статистически недостоверно (табл. 10).

Таблица 10

Косметическая активность (груминг) на фоне влияния
экстрактов м. лесного и м. лугового и экстракта валерианы

Время эксперимента	Активность	Объект					
		Контроль	М. лесной		М. луговой		Экстракт валерианы
			спиртовый экстракт	водный экстракт	спиртовый экстракт	водный экстракт	
До опыта	Короткая	1.0±0.30					
	Длительная	0.40.22					
10 дней	Короткая	1.0±0.37	2.0 [#] ±0.31	1.9±0.34	3.3* [#] ±0.36	2.0±0.38	1.1±0.26
	Длительная	0.5±0.20	0.3±0.18	0.6±0.20	1.1±0.26	1.3* [#] ±0.29	0.9±0.18
20 дней	Короткая	1.0±0.28	2.3±0.89	1.1±0.40	1.1±0.40	3.6* [#] ±0.81	1.7±0.47
	Длительная	0.4±0.28	1.1±0.40	1.0±0.38	0.7±0.29	0.9±0.14	1.0±0.22
30 дней	Короткая	1.1±0.34	1.6±0.72	0.6±0.30	1.9±0.42	2.1±0.51	1.4±0.43
	Длительная	0.4±0.30	0.7±0.18	1.0±0.31	1.0±0.22	0.9±0.26	1.3* [#] ±0.18

Примечание: * - различия со значением исследуемого показателя в контроле достоверны
- различия со значением исследуемого показателя начала опыта достоверны

Таким образом, из полученных данных следует, что м. лесной и м. луговой обладают седативной активностью, по силе сопоставимой с экстрактом валерианы.

Испытания на острую токсичность

Острую токсичность определяли при пероральном введении на нелинейных белых мышах массой 17 – 25 г. Экстракты вводили в виде водного раствора или суспензии из расчета 0.5 мл на 10 г массы.

В результате проведенных исследований установлено, что при внутрижелудочном введении мышам водных растворов экстрактов *M. sylvaticum* L. в дозе 5000 мг/кг веса животного видимых изменений в поведении животных не наблюдалось, летальность в экспериментальной группе животных отсутствовала. ЛД₅₀ выявить не удалось. Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод о практической безвредности экстрактов м. лесного и их принадлежности к 4 классу опасности (вещества малоопасные) по ГОСТ 12.1.007-76.

Заключение

На основании проведенных исследований можно сделать общие выводы:

1. Проведена оценка запасов сырья м. лесного в центральной части ареала распространения на территории России: Костромской области. Биологический и эксплуатационный запасы могут обеспечить промышленную заготовку сырья.

2. В результате анатомического изучения выявлены диагностические признаки вегетативных и генеративных органов м. лесного, установлено анатомическое сходство с м. луговым.

3. Установлено, что основными группами БАВ м. лесного являются флавоноиды и иридоиды. С помощью аутентичных образцов, хроматографическими и спектральными методами идентифицированы флавоноиды цинарозид и гиперозид, умбелиферон, хлорогеновая кислота, аукубин. Определено количественное содержание иридоидов и флавоноидов в траве и органах м. лесного. Изучен состав аминокислот м. лесного и м. лугового. Определен качественный состав и количественное содержание жирных кислот в семенах м. лесного и м. лугового. Доминирующими являются непредельные жирные кислоты (линоленовая, линолевая, олеиновая). Определен микроэлементный состав м. лесного.

4. Изучена биологическая активность экстрактов м. лесного и м. лугового. Установлено антикоагулянтное, противосудорожное, седативное, нейромодуляторное антиалкогольное действие. Приоритет исследований подтвержден патентом РФ на изобретение способа получения средства, обладающего седативной, противосудорожной и нейромодуляторной антиалкогольной активностью. Определена низкая токсичность экстрактов м. лесного.

5. Разработан проект ФС «Марьянника лесного трава».

Рекомендации. Результаты диссертационного исследования могут служить основой для поиска новых источников лекарственного растительного сырья среди представителей рода Марьянник, расширения ресурсной базы растений, обладающих антикоагулянтным, седативным, противосудорожным, нейропротекторным действием. Сопоставление морфологически и экологически близких видов позволяет более подробно изучить отличия в их химическом составе и биологической активности и определить направление для дальнейших исследований и практического применения.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в дальнейшем исследовании химического состава и биологической активности представителей рода Марьянник, разработке современных методик анализа и стандартизации растительного сырья, расширения номенклатуры лекарственных растительных объектов и получения препаратов на их основе.

Список опубликованных работ

1. Пат. 2613312 Российская Федерация, МПК А61К 36/185. В01D 11/02. А61Р 25/20. А61Р 25/08. А61Р 25/32. Способ получения средства, обладающего седативной, противосудорожной и нейропротекторной антиалкогольной активностью [Текст] / Э. А. Коркотян, Е. Е. Галишевская, Е. Н. Скрябина, А. С. Боталова; заявитель и патентообладатель ГБОУ ВПО ПГФА Минздрава России. - № 2014135591; Заявл. 01.09.2014; Оpubл. 15.03.2017; Приор. 01.09.2014 (Россия), Бюлл. № 8. – 8 с.

2. Галишевская, Е. Е. Фенольные соединения растений рода Марьянник / Е. Е. Галишевская, В. М. Петриченко, Е. Н. Скрыбина // **Фармация**. – 2011, №2. - С. 25 – 29.
3. Скрыбина, Е. Н. Некоторые морфолого-анатомические особенности и состав жирных кислот масла семян четырех видов растений рода Марьянник (*Melampyrum* L.) / Е. Н. Скрыбина, Е. Е. Галишевская, А. В. Агафонцева // **Современные проблемы науки и образования**. – 2012, 5; URL: www.science-education.ru/105-7042.
4. Скрыбина, Е. Н. Аминокислоты растений рода *Melampyrum* L. / Е. Н. Скрыбина, Е. Е. Галишевская, В. Д. Белоногова // **Медицинский альманах**. – 2012, №5 (24). - С. 206 – 208.
5. Korkotian, E. Complex effects of aqueous extract of *Melampyrum pratense* and of its flavonoids on activity of primary cultured hippocampal neurons / E. Korkotian A. Botalova, T. Odegova [et al.] // **Journal of Ethnopharmacology**. - 2 April 2015, Volume 163. - Pages 220–228.
6. Галишевская, Е. Е. Седативная активность водных экстрактов некоторых представителей рода *Melampyrum* L. / Е. Е. Галишевская, Е. Н. Скрыбина, В. Д. Белоногова // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. – 2016, Т. 18, №2(3). - С. 658 – 652 [Электронный ресурс]. URL: http://www.ssc.smr.ru/media/journals/izvestia/2016/2016_2_658_662.pdf.
7. Скрыбина, Е. Н. УФ-спектральная характеристика извлечений из травы марьянника лесного / Е. Н. Скрыбина, Н. С. Тяпугина // Вестник ПГФА: научно-практический журнал. Пермь. – 2009, №5. - С. 193 – 195.
8. Скрыбина, Е.Н. Исследование химического состава марьянника лесного / Е.Н. Скрыбина, Е. Е. Галишевская, В. Ф. Левинова // Вестник ПГФА: научно-практический журнал. Пермь. – 2010, №6. - С. 226 – 229.
9. Отинова, Е. В. Влияние экстрактов и флавоноидов марьянника лесного и марьянника лугового на свертывание крови / Е. В. Отинова, Е. Н. Скрыбина // Материалы 76-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием: молодежная наука и современность (19 – 20 апреля). Курск. - 2011. - С. 266.

10. Петриченко, В. М. Гипотензивная и антикоагулянтная активность растений семейства Норичниковые/ В. М. Петриченко, Б. Я. Сыропятов, Е. Н. Скрыбина // Научно-методическая конференция «Гаммермановские чтения – 2011»: сборник научных трудов. СПб.: Издательство СПХФА. - 2011. - С. 57 – 59.

11. Скрыбина, Е. Н. Изучение водорастворимых флавоноидов марьянника лугового / Е. Н. Скрыбина, А. А. Николаева, Д. В. Стрелкова // Вестник ПГФА. – 2011, №8. - С. 186 – 188.

12. Скрыбина, Е. Н. Ресурсоведческая характеристика марьянника лесного в Вохомском районе Костромской области / Е. Н. Скрыбина, Е. Е. Галишевская, В. Ф. Левинова // Материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Пермской государственной фармацевтической академии (7 – 9 декабря 2011 года, г. Пермь). Пермь. - 2011. - С. 242 – 245.

13. Отинова, Е. В. Влияние водных и спиртовых экстрактов различных видов марьянника на свертываемость крови / Е. В. Отинова, В. М. Петриченко, Б.Я. Сыропятов [и др.] // Український науково-медичний молодіжний журнал. Київ. – 2011, №1. - С. 29 – 31.

14. Галишевская, Е. Е. Ресурсоведческая характеристика двух видов растений рода Марьянник (*Melampyrum* L.) / Е. Е. Галишевская, Е. Н. Скрыбина, В. Ф. Левинова // *Materialy VII Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Perspektywiczne opracowania są nauką i technikami - 2011».* – 2011, Volume 42: *Nauk biologicznych.: Przemysł. Nauka i studia.* – Str. 14 – 18.

15. Гребенкина, А. В. Седативная активность экстрактов *Melampyrum sylvaticum* L. и *Melampyrum pratense* L. / А. В. Гребенкина, П. А. Левина, М. А. Федорова [и др.] // *Современные научные исследования и инновации.* – 2015, № 1 [Электронный ресурс]. URL: <http://web.snauka.ru/issues/2015/01/43029>.

Благодарность. Автор выражает искреннюю благодарность за помощь в работе сотрудникам кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, кафедры физиологии ФГБОУ ВО ПГФА, Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН.