

ЛОГВИНОВА ЛЮДМИЛА АНАТОЛЬЕВНА

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И КАРДИОТРОПНЫЕ СВОЙСТВА
ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НИЗИННОГО
ДРЕВЕСНО-ТРАВЯНОГО ТОРФА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук**

Пермь – 2019

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

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент **Зыкова Мария Владимировна**

Научный консультант:

доктор биологических наук, доцент **Ласукова Татьяна Викторовна**

Официальные оппоненты:

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 кафедры;

Лужанин Владимир Геннадьевич – кандидат биологических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии, заведующий кафедрой.

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

Защита состоится «24» декабря 2019 г в _____ 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, 2, тел. (342) 233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в научной 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 «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ И СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. Комплексной терапии синтетическими лекарственными средствами не смотря на высокую эффективность присущ ряд существенных недостатков. Во-первых, узкая направленность терапевтического воздействия, что вынуждает лечащего врача к одновременному назначению большого количества лекарственных препаратов, а также малая терапевтическая широта. Во-вторых, побочные эффекты, их пропорциональный рост с увеличением числа одновременно назначенных лекарственных препаратов и продолжительности приема. В-третьих, ограничение в применении для таких возрастных групп, как дети и пожилые люди. Комплексная терапия лекарственными средствами растительного происхождения, напротив, имеет диаметрально противоположные черты. Она характеризуется отсутствием острой/хронической токсичности и способности к кумуляции, сохранением терапевтического эффекта после отмены курсовой терапии, а также разносторонним комплексным воздействием, направленным на восстановление и коррекцию нарушенного гомеостаза.

К одному из видов биологически активных веществ (БАВ) естественного генеза, обладающих вышеупомянутыми положительными свойствами, относятся гуминовые вещества и их преобладающая по количественному содержанию фракция – гуминовые кислоты. Гуминовые вещества, являясь основной формой кумулированного органического углерода на планете, выполняют важные биосферные функции. Более того, гуминовые вещества нашли самое широкое применение в сельском хозяйстве, животноводстве, медицине и признаны актуальным направлением «Green Chemistry» как максимально безопасные для здоровья человека и окружающей среды.

Гуминовые вещества находятся во многих природных объектах таких, как: почва, торф, сапропель, уголь, мумиё, меланоиды и др. Но наиболее перспективным сырьевым источником получения гуминовых веществ, как БАВ, является торф. Торф открывает генетическую ветвь твердых горючих ископаемых, отличается большим видовым разнообразием, ботаническим составом и относится к возобновляемым природным ресурсам. Гуминовые вещества ввиду сложности молекулярной организации характеризуются амфифильностью, и, как следствие, возможностью влиять на многие клетки и их субклеточные компоненты, органы и системы органов, проявляя при этом ряд положительных биологических эффектов. В литературе известно о модулирующем воздействии гуминовых кислот на нейроны, гепатоциты, клетки красной и белой крови, клетки эпидермиса, поджелудочной железы, антигенпрезентирующие клетки.

Ранее группой ученых СибГМУ (М.В. Белоусов, М.В. Зыкова и др.) были проведены фармакологические исследования нативных гуминовых кислот торфа при их внутрибрюшинном введении в заведомо летальных дозах с целью определения органов-мишеней. В итоге было сделано заключение, что смерть животных наступала от острой

сердечной недостаточности, возникшей в результате ишемической дистрофии миокарда. Проявление подобных механизмов кардиоактивного действия характерно для миотропных препаратов – средств, влияющих на ионные каналы (блокаторы кальциевых каналов, активаторы калиевых каналов), донаторы NO. В результате чего была выдвинута гипотеза о наличии прямых кардиотропных (кардиоваскулярных) эффектов при введении гуминовых кислот торфа в терапевтических дозах, что и послужило отправной точкой для продолжения исследования фармакологической активности гуминовых кислот торфа в данном направлении.

Сердечно-сосудистые заболевания имеют неуклонную и негативную тенденцию к росту и омоложению не смотря на большое количество используемых лекарственных средств и высокотехнологических видов помощи. Поиск новых лекарственных субстанций для доступной превентивной терапии и эффективного патогенетического лечения ишемической болезни сердца является стратегической задачей мирового здравоохранения. Исследование кардиопротективных свойств гуминовых веществ торфа и механизмов их реализации, учитывая значительный сырьевой потенциал торфа и высокую биологическую активность выделенных из него гуминовых кислот, является актуальной и перспективной задачей отечественного здравоохранения. Решение данной задачи позволит разработать на основе гуминовых кислот торфа новые эффективные и обладающие экспортным потенциалом отечественные препараты для профилактики и лечения кардиопатологий.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: В результате комплексного исследования физико-химических и кардиотропных свойств гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа предложить перспективное биологически активное вещество гуминовой природы и установить параметры его стандартизации.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ:

1. Провести сравнительное фармакогностическое исследование двух низинных древесно-травяных видов торфа с различных болот Томской области.
2. Провести сравнительное исследование физико-химических параметров структуры гуминовых кислот, выделенных из двух низинных древесно-травяных видов торфа с различных болот Томской области для выбора перспективного объекта исследования биологической активности.
3. Провести исследование кардиотропной, антиоксидантной и актопротекторной активности перспективного объекта гуминовых кислот торфа (биологически активного вещества гуминовой природы).
4. Предложить параметры стандартизации гуминовых кислот (биологически активного вещества гуминовой природы) и их сырьевого источника (низинного древесно-травяного торфа), подготовить проекты нормативной документации.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА ИССЛЕДОВАНИЯ. Впервые охарактеризованы общие и индивидуальные особенности строения молекул гуминовых кислот, выделенных из

одного вида торфа (низинного древесно-травяного), но с разных торфяных месторождений Томской области: проведено сравнительное исследование физико-химических параметров структуры методами спектрального (электронной, флуоресцентной, ИК, ^{13}C -ЯМР спектроскопии), титриметрического, элементного (C, H, N, O, S) анализа, эксклюзионной ВЭЖХ.

Впервые проведено исследование кардиопротекторных свойств гуминовых кислот, выделенных из низинного древесно-травяного вида торфа болота «Таган» Томской области методом ретроградной перфузии изолированного миокарда крыс по методу Лангендорфа по открытому контуру и изучение возможных механизмов кардиопротекции. В частности, методами физико-химического анализа (катодной вольтамперометрии, колориметрии с дифенилпикрилгидразилом и феррозином, спектроскопии электронного парамагнитного резонанса) установлены высокие антиоксидантные свойства гуминовых кислот. В тесте с введением неизбирательного ингибитора NO-синтазы L-NAME установлена способность гуминовых кислот влиять на NO-систему внутриклеточной передачи сигнала. Впервые установлено отличительное кардиопротекторное свойство гуминовых кислот торфа – восстанавливать сократительную функцию миокарда в реперфузионный период.

Впервые проведено исследование актопротекторных свойств гуминовых кислот, выделенных из низинного древесно-травяного вида торфа болота «Таган» Томской области на модели хронического пятидневного предъявления животным теста принудительного плавания до полного утомления. Установлены высокие показатели работоспособности и резистентности к физической нагрузке.

На основании проведенного исследования фармакологической активности (в экспериментах *in vitro* и *in vivo*) впервые обоснован перспективный образец гуминовых кислот, выделенный из низинного древесно-травяного вида торфа болота «Таган» Томской области, как эффективный кардиопротектор для повышения работоспособности и физической выносливости.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ.

Результаты, полученные в ходе сравнительного физико-химического анализа структуры и свойств различных гуминовых кислот, позволили выявить общие и индивидуальные особенности строения молекул гуминовых кислот, выделенных из одного типа и вида торфа (на примере низинного древесно-травяного), но с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган»).

На основании результатов физико-химического анализа гуминовых кислот обоснованы методы контроля качества для определения параметров стандартизации биологически активного вещества гуминовой природы (гуминовых кислот) и их сырьевого источника (торфа). На основании разработанных методик и подходов к стандартизации гуминовых кислот и торфа предложены два проекта нормативной

документации: «Торф низинный древесно-травяной» и «Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа».

Перспективный объект (биологически активное вещество гуминовой природы) – гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа болота «Таган» предложен для разработки малотоксичных лекарственных средств растительного происхождения, способных оказывать кардиопротекторное, антиоксидантное и актопротекторное действия для вспомогательной терапии ишемической болезни сердца, повышения физической работоспособности и выносливости человека, а также для использования у лиц, специализирующихся в различных видах спорта или занятых тяжелым физическим трудом.

Диссертационное исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-43-700014 р_а «Фармакологическое исследование специфических органических веществ торфов Томской области» и государственного задания «Кардиоваскулярные эффекты, индуцированные природными высокомолекулярными соединениями гуминовой природы, и возможные механизмы их реализации» (Рег. № АААА-А17-117032210074-6).

Результаты диссертационной работы используются: в учебном процессе кафедры медико-биологических дисциплин ФГБОУ ВО ТГПУ (акт внедрения от 02.09.2019), кафедр химии (акт внедрения от 02.09.2019), фармацевтического анализа (акт внедрения от 02.09.2019) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ. В соответствии с поставленной целью и задачами исследования были выбраны современные методы физико-химического анализа параметров структуры и свойств гуминовых кислот и их сырьевого источника – торфа, а также методы исследования биологической активности. В работе использовали действующие ГОСТы и общие фармакопейные статьи согласно ГФ XIV издания. Методы физико-химического анализа параметров строения гуминовых кислот: электронная (УФ и В), флуоресцентная, ИК, ^{13}C -ЯМР спектроскопия, элементный (C, H, N, O, S) и титриметрический анализ, эксклюзионная ВЭЖХ. Методы исследования антиоксидантной активности: катодная вольтамперометрия, колориметрия с дифенилпикрилгидразилом и феррозином, спектроскопия электронного парамагнитного резонанса. Методы исследования биологической активности: кардиотропной – ретроградная перфузия по методу Лангендорфа по открытому контуру, актопротекторной – нагрузочный тест (принудительное плавание). Биохимические методы исследования: определение уровня креатинфосфокиназы, активности эндотелиальной NO-синтазы (e-NOS).

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с помощью программы STATISTICA 8.0. Результаты обрабатывали, используя непараметрический U-критерий Манна-Уитни и представляли в виде среднего арифметического (M) $\pm$ стандартная ошибка среднего (статистически значимые

различия при $p < 0,05$). Данные эксперимента по установлению актопротекторной активности представлены в виде квартилей ($Q_1 - 25\%$; $Q_3 - 75\%$) и медианы (Me). Анализ множественных сравнений проводили непараметрическими тестами Краскала-Уолиса и Фридмана. Достоверность различий между группами устанавливали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни, используемого для двух независимых выборок и критерия Вилкоксона, используемого для проверки различий между зависимыми выборками ($p < 0,05$). Для оценки характера распределений между группами применяли критерий « χ -квадрат».

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

1. Результаты сравнительного фармакогностического исследования двух низинных древесно-травяных видов торфа с различных болот Томской области, характеристика физико-химических параметров структуры, выделенных из них гуминовых кислот, и обоснование выбора перспективного объекта исследования биологической активности.

2. Результаты исследования кардиотропной, антиоксидантной и актопротекторной активностей перспективного объекта – гуминовых кислот низинного древесно-травяного торфа болота «Таган» и оценка возможных механизмов их реализации.

3. Параметры стандартизации гуминовых кислот и торфа, проекты нормативной документации на сырьевой источник (торф) и перспективное биологически активное вещество гуминовой природы (гуминовые кислоты).

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА. Автором самостоятельно проведен анализ литературы, отбор образцов торфа на болотах Томской области, анализ фармакогностических и технологических параметров торфа, выделение гуминовых кислот, исследование гуминовых кислот спектральными методами (электронной, флуоресцентной, ИК спектроскопии) и титриметрического анализа, исследование антиоксидантной активности гуминовых кислот колориметрическими методами. Исследование ботанического состава торфа, исследование гуминовых кислот методами эксклюзионной ВЭЖХ, элементного (C, H, N, O, S) состава, антиоксидантной активности методами спектроскопии электронного парамагнитного резонанса и катодной вольтамперометрии, кардиотропной и актопротекторной активности проведены при непосредственном личном участии автора. Исследование гуминовых кислот методом ^{13}C -ЯМР спектроскопии выполнено в научно-исследовательской лаборатории природных гуминовых систем кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Правительства РФ, за что автор выражает глубокую благодарность заведующему лабораторией, доктору химических наук, профессору И.В. Перминовой и старшему научному сотруднику, кандидату химических наук А.И. Константинову. Исследование гуминовых кислот методом синхронной флуоресцентной спектроскопии выполнено в Department of Microbiology and Immunology, Montana State University

(Bozeman, 59718, USA), за что автор выражает глубокую благодарность профессору И.А. Щепёткину (PhD, MD). Исследование актопротекторной активности гуминовых кислот выполнено в экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий Филиала ТНИИ курортологии и физиотерапии ФГБУ СибФНКЦ ФМБА России, за что автор выражает глубокую благодарность научному сотруднику, кандидату биологических наук А.А. Гостюхиной. Исследование кардиопротекторной активности гуминовых кислот выполнено в лаборатории экспериментальной кардиологии НИИ кардиологии Томского НИМЦ, за что автор выражает глубокую благодарность доктору биологических наук, доценту Ласуковой Т.В.

Автором самостоятельно проведена математическая обработка данных, разработка проектов нормативной документации, написание и оформление рукописи диссертации и автореферата. Анализ и интерпретация результатов исследования проведена при непосредственном личном участии автора, научного руководителя и научного консультанта. Подготовка печатных работ по теме диссертации проходила при непосредственном личном участии автора.

СООТВЕТСТВИЕ ДИССЕРТАЦИИ ПАСПОРТУ НАУЧНОЙ СПЕЦИАЛЬНОСТИ. Диссертация соответствует пункту 2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств», пункту 6 – «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе» паспорта специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

СВЯЗЬ ЗАДАЧ ИССЛЕДОВАНИЯ С ПРОБЛЕМНЫМ ПЛАНОМ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ НАУК. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом НИР ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России «Изыскание и изучение новых лекарственных средств. Вопросы фармации» (№ гос. регистрации темы 01.02.00.101708) и комплексной программы «Инновационные технологии новых фармацевтических продуктов на основе природных биологически активных комплексов» (регистрационный номер: AAAA-A16-116021010208-2 от 10.02.2016 г).

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ. Результаты диссертационной работы и основные положения представлены и обсуждены на 7 научных конференциях: Fourth International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies «From Molecular Analysis of Humic Substances – to Nature-like Technologies» (HIT-2017) (Moscow, 2017); XXIV и XXV Российских национальных конгрессах «Человек и лекарство» (Москва, 2017, 2018 гг); XXI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых

«Наука и образование» (Томск, 2017 г); Международной научной конференции «Современное состояние черноземов» (Ростов-на-Дону, 2018 г); VII Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Д.С. Орлова и III Международной научной школы «Методы оценки биологической активности гуминовых продуктов» (Москва, 2018 г); Международной научно-практической конференции, посвященной памяти А.Ф. Гаммерман «Гаммермановские чтения» (Санкт-Петербург, 2019 г).

ПУБЛИКАЦИИ. По материалам диссертационной работы опубликовано 15 печатных работы, в т.ч. 6 статей в журналах, рекомендуемых ВАК при Министерстве образования и науки РФ для публикации результатов кандидатских и докторских диссертаций.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Диссертационная работа изложена на 243 страницах компьютерного текста, содержит: введение, обзор литературы (глава 1), материалы и методы исследования (глава 2); экспериментальные главы (глава 3-5), заключение, приложения; содержит 35 таблиц, 28 рисунков. Список литературы включает 280 библиографических источника, из которых 163 отечественных и 117 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. В обзоре литературы приводится информация о характеристике торфа как сырьевого источника биологически активных веществ (БАВ). Описывается его высокая востребованность для многих отраслей народного хозяйства, в т.ч. для ветеринарии и медицины. Это связано с присутствием в нем широкого спектра БАВ, особая роль среди которых отводится специфическим органическим веществам торфа – гуминовым веществам (ГВ) и их доминирующей фракции – гуминовым кислотам (ГК). Два раздела главы 1 посвящены обзору современного состояния в области исследования структуры, химических свойств и биологической активности ГК. Отмечается, что благодаря полифункциональному строению, ГК могут участвовать в протолитических, окислительно-восстановительных реакциях, реакциях донорно-акцепторного типа, а также взаимодействиях за счет обмена лигандов и обладают очень широким спектром биологической активности. Гуминовые кислоты и препараты на их основе применяются в качестве противомикробных, противогрибковых, противоопухолевых, противовирусных и регенераторных средств, антиоксидантов, цитопротекторов, иммуномодуляторов, детоксикантов и мн. др. В обзоре литературы также приводится анализ современного состояния терапии сердечно-сосудистых заболеваний, а также говорится о целесообразности использования растительных кардиопротекторов.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Объектами исследования являются гуминовые кислоты, выделенные 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида из двух низинных древесно-травяных видов торфа, заготовленных в летний период на разных торфяных месторождениях Томской области – «Клюквенное» и «Таган» (естественный участок).

Методы исследования. Фармакогностические параметры торфа (степень разложения, общая зола и зола, нерастворимая в хлороводородной кислоте, ботанический состав) устанавливали стандартными методами (ОФС ГФ XIV, ГОСТы), количественное определение ГК – гравиметрически.

Гуминовые кислоты выделяли из торфа по схеме, представленной на Рисунке 1 (Зыкова М.В., 2019).



Рисунок 1 – Схема выделения гуминовых кислот из торфа

Методы химического исследования гуминовых кислот. Запись электронных спектров поглощения в УФ- и В- области (190-800 нм) осуществляли на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ (Экротхим, Россия). Находили коэффициенты экстинкции при $\lambda = 465$ и 650 нм, рассчитывали коэффициент цветности $Q_{4/6}$ по Е. Вельте. Измерение флуоресценции 0,0004%-ых растворов (фосфатный буфер, pH=6,86) проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent, США) с постоянной разностью монохроматора $\Delta\lambda=20$ нм, с шагом 1 нм при $\lambda_{\text{возб}}=270, 310$ и 355 нм. Регистрацию спектров синхронной флуоресценции в NaHCO_3 (25 мМ, pH 8,5) проводили с использованием люминесцентного спектрометра LS50B (Perkin Elmer,

Norwalk, CT, США) в диапазоне 250-600 нм (скорость сканирования 240 нм/мин). Ширина щели 10 нм, разница длин волн возбуждения-излучения ($\Delta\lambda$) 20 нм. Флуоресцентную спектроскопию использовали для определения индекса гумификации (HIX). Регистрацию ИК спектров проводили на ИК Фурье спектрометре ФСМ 2201 (Инфраспек, Россия) в диапазоне волновых чисел 500-4000 см^{-1} в таблетках с KBr (соотношение 1:100). Относительное содержание функциональных групп определяли на основании отношений оптических плотностей полос поглощения (ОППП). Содержание кислотных функциональных групп устанавливали титриметрически в токе азота с применением цифровой бюретки TopBuretteH 5000 per rotation (Аналитик-Лаб, Россия): заместительным кальций-ацетатным титрованием – содержание карбоксильных групп, обратным баритовым – сумму фенольных и карбоксильных групп. Элементный состав определяли путем сжигания на элементном анализаторе CHNS Flash 2000 (Thermo Fisher Scientific, Великобритания), содержание кислорода вычисляли по разности. Массовые доли элементов ($\%_{\text{mass}}$) рассчитывали на основании градуировочных зависимостей, атомные доли элементов ($\%_{\text{atom}}$), атомные отношения – по общепринятым методам, предложенным Д.С. Орловым и Е.М. Заславским, исправленное H/C ($H/C_{\text{испр}}$) – с использованием модифицированной формулы Ван-Кревелена, среднюю степень окисления атома углерода (ω) – по методу Ю.А. Жданова. Регистрацию ^{13}C -ЯМР спектров и запись их интеграла осуществляли на ЯМР Фурье-спектрометре AVANCE 400 (400 МГц) фирмы Bruker (Германия) с рабочей частотой 100 МГц для ядер ^{13}C в режиме INVGATE, используя импульсную последовательность CPMG с первым импульсом последовательности 90° , временем регистрации сигнала спада свободной индукции 0,2 с и временем релаксационной задержки 7,8 с, навеску ГК растворяли в NaOD/D₂O. Зарегистрированные сигналы спада свободной индукции подвергали умножению на спадающую экспоненту с параметром уширения спектральной линии (lb) 100 Гц и последующему преобразованию Фурье для перевода сигнала с разверткой по времени в спектр с разверткой по частоте (м.д.) от несущей частоты спектрометра (100 МГц для ядер ^{13}C). Обработку и преобразование спектров осуществляли при помощи программного обеспечения «MestReC», интегрирование спектров по интервалам – с использованием программного обеспечения «GelTreat» (автор и правообладатель – А.В. Кудрявцев). Молекулярно-массовое распределение (ММР) исследовали методом эксклюзионной ВЭЖХ, хроматографическая система - Dionex Ultimate 3000 (Thermo, США): неподвижная фаза – колонка для эксклюзионной хроматографии Ultrahydrogel 250, 250 Å, 7,8 x 300 мм (Waters, США), подвижная фаза: 0,1 М трис-HCl буферный раствор с pH=8,86, скорость потока элюента 0,5 мл/мин. Хроматографические условия: объем вводимой пробы 10 мкл, температура термостата колонки 30°C, детектирование спектрофотометрическое при длине волны 220 нм. Строили калибровочную зависимость с использованием стандартных растворов – натриевой соли полистиролсульфата (1 мг/мл, GmbH, Германия), с молекулярными

массами 1100, 1830, 4230, 10600, 29100, 75600, 148000, 261000 и 466000 Да. Хроматограммы обрабатывали с использованием программного обеспечения Chromeleon 6.8. Вычисляли параметры молекулярной массы: M_i – молекулярная масса i -ого фрагмента, H_i – высота пика i -ого фрагмента, M_w – среднемассовая молекулярная масса, M_n – среднечисленная молекулярная масса, M_p – медиана, p – полидисперсность.

Экспериментальные животные, этические и правовые нормы доклинического исследования. Все процедуры (содержание, введение исследуемых веществ, умерщвление) были проведены в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях. Этическая экспертиза проведена, протокол экспериментов на животных соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований.

Методы исследования кардиотропной активности гуминовых кислот. Использовали 98 аутбредных крыс-самцов Wistar. Исследования инотропных, хронотропных и кардиопротекторных эффектов ГК, растворенных в изотоническом растворе Кребса-Хензеляйта, проведены на модели изолированного перфузируемого по методу Лангендорфа по открытому контуру сердца крысы. Выделенное сердце переносили в охлажденный до $+4^{\circ}\text{C}$ раствор Кребса-Хензеляйта, после чего помещали в термостабилизированную увлажненную камеру и вводили канюлю в восходящую дугу аорты, через которую поступали изотонический раствор Кребса-Хензеляйта и карбоген. Условия перфузии: температура раствора $+37\pm0,5^{\circ}\text{C}$, перфузионное давление – 52 мм рт. ст., pH = 7,5, конечное диастолическое давление левого желудочка (КДДЛЖ) – 10-15 мм рт. ст. Измерение давления в ЛЖ осуществляли с помощью аппарата MP35 (Biopac System Inc., США), количественную обработку данных – с помощью программного обеспечения INSTBSL-W (Biopac System Inc., США).

Характеристиками измеряемых параметров сократимости изолированного сердца являлись: 1) частота сердечных сокращений (ЧСС, (уд/мин)); 2) давление, развиваемое левым желудочком (ДРЛЖ, мм рт. ст.); 3) конечное диастолическое давление (КДД, мм рт. ст.). Коронарный проток измеряли путем подсчета количества перфузата, протекающего через сердце за 1 мин в пересчете на 1 г сырой массы ткани сердца.

Определение креатинфосфокиназы (КФК) в перфузионном растворе осуществляли колориметрически при $\lambda = 340$ нм на спектрофотометре Smart Spec Plus («Bio-Rad», США) с использованием энзиматических наборов («Analiticon Biotechnologies AG», Германия).

Методы исследования актопротекторной активности гуминовых кислот. Использовали 40 аутбредных крыс-самцов Wistar. Животные были разделены на 4 группы по 10 особей: 1) интактная – крысы, не подвергшиеся никаким воздействиям; 2) контрольная (группа № 1) – крысы, подвергшиеся физической нагрузке (плавательный тест); 3) контрольная (группа № 2) – крысы, подвергшиеся физической нагрузке и получавшие 0,9% NaCl внутривенно по 0,5 мл на 100 г массы животного

за 30 мин до плавательного теста; 4) опытная группа – крысы, подвергшиеся физической нагрузке и получавшие образец ГК-2 по 0,5 мл 5% раствора на 100 г массы животного за 30 мин до плавательного теста. По завершению 5 дней тестирования животные выводились из эксперимента одномоментным декапитированием под CO_2 -наркозом. У декапитированных животных для получения сыворотки осуществляли забор крови. Для оценки уровня гликолитических процессов при физической нагрузке устанавливали содержание лактата в сыворотке крови крыс колориметрическим методом с использованием реагентов «Ольвекс диагностикум» (Санкт-Петербург) на анализаторе «BiochemSA» (High Technology, США) при $\lambda = 500$ нм.

Физико-химические методы исследования антиоксидантной активности гуминовых кислот. Регистрацию ЭПР-спектров осуществляли на спектрометре X-частотного диапазона при 20-25°C (Bruker EMX EPR, Германия). Модуляция магнитного поля составляла 100 кГц с амплитудой в 1 гаусс, микроволновая мощность – 2,03 мВ. Количество парамагнитных центров (ПМЦ – интенсивность сигнала $I_{\text{абс}}$, 10^{16} спин/грамм) и ширина синглетной линии сигнала ЭПР (ΔH) рассчитывались автоматически. Регистрацию параметров катодной вольтамперометрии осуществляли на анализаторе «АОА» (г. Томск) с использованием ртутного пленочного электрода. Показателем антиоксидантной активности (АОА) являлся коэффициент каталитической активности (K , мкмоль/л*мин), выражающий степень изменения тока электровосстановления кислорода (ЭВ O_2). Колориметрическую оценку антирадикальной активности ГК проводили на спектрофотометре ПЭ-5400 УФ (Экротхим, Россия) при $\lambda = 520$ нм по реакции взаимодействия со стабильным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ). Препаратом сравнения выступал дигидрохверцетин. Колориметрическую оценку железосвязывающей (хелатирующей) активности ГК проводили на спектрофотометре Unico 2800 (Италия) при $\lambda = 562$ нм по реакции взаимодействия ГК с комплексом феррозин- Fe^{2+} . Препаратом сравнения выступал ЭДТА.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 3 ХАРАКТЕРИСТИКА ТОРФА И ИССЛЕДОВАНИЕ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ АНАЛИЗА

Сравнительное фармакогностическое исследование двух низинных древесно-травяных видов торфа. Выделение гуминовых кислот. Результаты фармакогностического исследования торфа (степени разложения, общей золы и золы, не растворимой в 10 %-ной хлороводородной кислоте, ботанического состава) двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений («Клюквенное» и «Таган») позволили заключить, что они являются очень близкими по своему происхождению (Таблица 1). Наиболее предпочтительным для целей выделения ГК является образец торфа с месторождения «Таган», т.к. отличается более высокой степенью разложения (на 5 %), меньшей зольностью (на 2,5 %) и меньшим содержанием

минеральных примесей (на 1 %). Выделенные торфяные ГК представляют собой беззольный ($A_{ГК}=0\%$) аморфный порошок темно-коричневого цвета, без запаха. Практически одинаковое количественное содержание ГК (Таблица 1) в двух древесно-травяных видах торфа с разных торфяных месторождений может указывать на идентичность в их параметрах строения и свойств, обусловленных происхождением.

Таблица 1 – Фармакогностическая характеристика образцов торфа

Место отбора торфа (глубина отбора, см)	¹ R, %	² A, %	³ X, %	Ботанический состав (частей растительных остатков)	⁴ ГК, %	⁵ A _{ГК} , %
болото «Клюквенное» (10-50)	25-30	8,92±0,11	3,98±0,10	<i>Carex lasiocarpa</i> Ehrh. (10); <i>Carex cespitosa</i> L. (5); <i>Carex omskiana</i> Meinsh. (15); <i>Menyanthes trifoliata</i> L. (25); <i>Equisetum fluviatile</i> L. (10); <i>Sphagnum centrale</i> C.E.O. Jensen (5); древесина кустарников (30)	38,20±0,31	0
болото «Таган» (50-100)	30-35	6,40±0,12	2,98±0,08	<i>Carex lasiocarpa</i> Ehrh. (50); <i>Menyanthes trifoliata</i> L. (15); <i>Equisetum</i> sp. (5); <i>Hypnaceae</i> (<i>Bryum</i> , <i>Meesia</i>) (+); <i>Polypodiophyta</i> (+); древесина кустарников (30)	38,77±0,32	0
Примечания 1 R, % – степень разложения торфа (процентное содержание в торфе бесструктурной массы) 2 A, % – содержание общей золы в торфе 3 X, % – содержание в торфе золы, не растворимой в 10 %-ной хлороводородной кислоте 4 ГК, % – процентное содержание гуминовых кислот в торфе при выделении раствором натрия гидроксида (в пересчете на органическую массу торфа) 5 A _{ГК} , % – зольность образцов гуминовых кислот						

Сравнительное исследование физико-химических параметров структуры гуминовых кислот, выделенных из двух низинных древесно-травяных видов торфа. Сравнительное исследование ГК из двух древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган») методами электронной, флуоресцентной, ИК и ¹³C ЯМР спектроскопии на основании сходства профилей полос поглощения/испускания и значений химических сдвигов, позволили установить общий принцип химического строения, что является интегральными параметрами их структуры (Рисунок 2).

Выявлен ряд общих элементов структуры и свойств: наличие ароматической части молекулы с алкильными заместителями нормального и разветвленного строения, система полисопряжения представлена фрагментами структуры, содержащими C=C-связи ароматического и алифатического ряда, а также включающая различные азот- и кислородсодержащие функциональные группы, специфическое спектральное свойство по данным флуоресцентной спектроскопии – гипсохромный сдвиг («синий сдвиг»), не характерное для каких-либо других природных соединений. Характерны отрицательная средняя степень окисления атома углерода и восстановительные свойства, амфифильный характер с преобладанием гидрофильных структур, одинаковая степень ароматичности с долей ароматических фрагментов в структуре порядка 33 %, высокая

полидисперсность и высокие молекулярные массы в диапазоне значений (121,4-261,5 кДа).

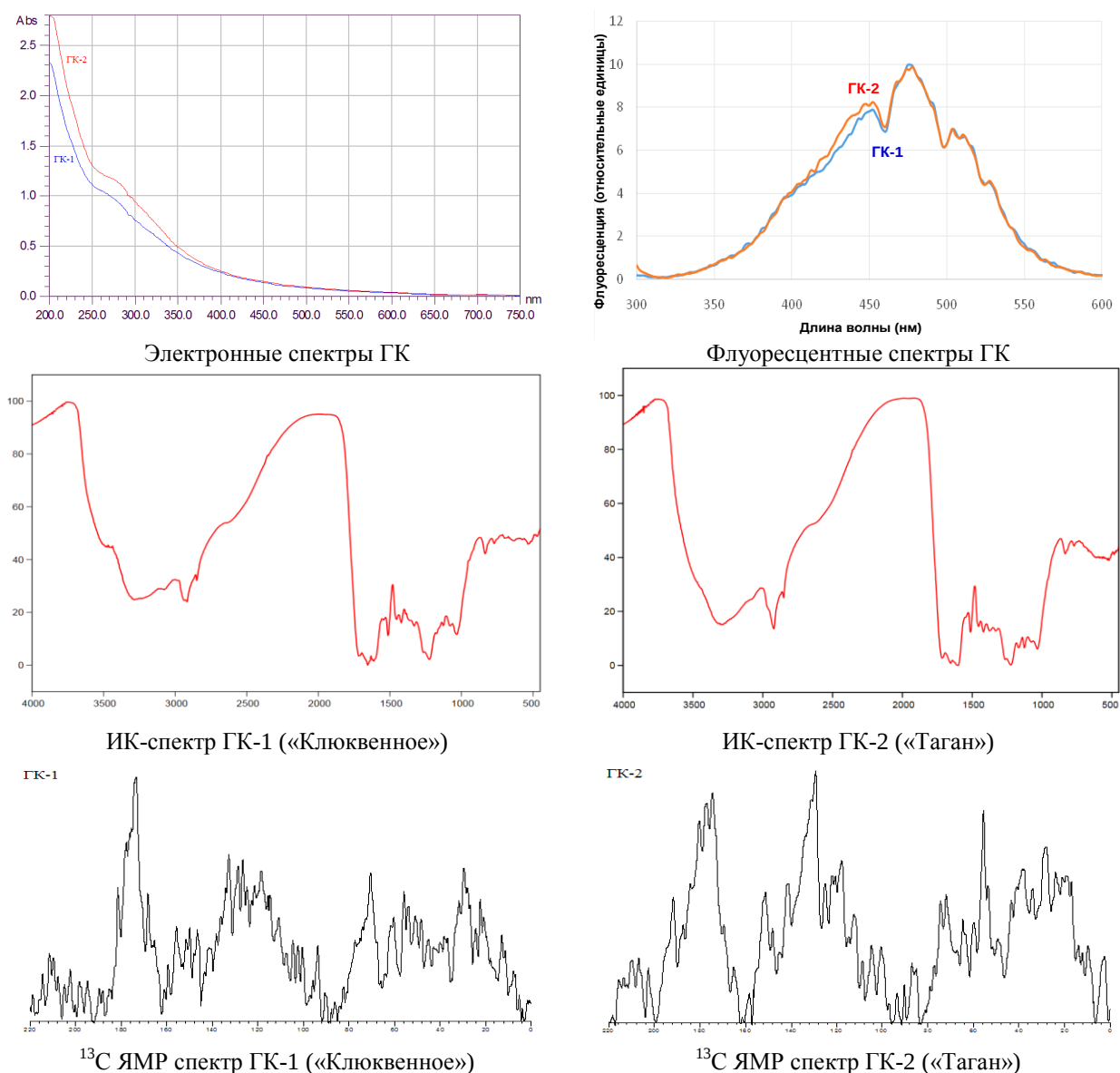


Рисунок 2 – Интегральные параметры структуры ГК

Отличительными (дифференциальными) параметрами структуры являются (Таблица 2): спектральные коэффициенты экстинкции (E_{465} — и E_{650} —величины) и цветности ($Q_{4/6}$) по данным электронной спектроскопии; длины волн максимумов флуоресценции (λ_{max} , нм) и величины гипсохромного сдвига ($\Delta 1$ и $\Delta 2$, нм); значения отношений ОППП-величин по данным ИК-спектроскопии; массовые ($\%_{\text{mass}}$) и атомные ($\%_{\text{atom}}$) доли элементов, значения атомных отношений элементов и средней степени окисления (ω) атома углерода по данным элементного (C, H, N, O, S) анализа; распределение атомов углерода по функциональным группам по данным ^{13}C ЯМР-спектроскопии; показатели ММР по данным эксклюзионной ВЭЖХ.

По данным электронной спектроскопии, образец ГК-2 отличается от ГК-1 наличием в его строении более протяженной и разветвленной системы полисопряжения,

включающей различные кратные связи (в основном $C=C$ и $C=O$), а также отличается меньшей степенью конденсированности ароматических структур в макромолекулах. Образец ГК-1 отличается более сложным молекулярным строением, бóльшим содержанием более объёмной циклической части молекулы, где преобладают поликонденсированные ароматические структуры. Образец ГК-2 является более легко поляризуемым и реакционно способным соединением, чем ГК-1.

По данным флуоресцентной спектроскопии, титриметрического и элементного анализа различия между двумя образцами ГК из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган») заключаются в том, что для образца ГК-2 (выделенного из торфа с болота «Таган») характерны: более высокий индекс гумификации (НІХ), следовательно, более высокое содержание в его молекуле структур типа хинона, гидрохинона и семихинона, отвечающих за антирадикальную активность, также более высокое содержание азота и более высокие значения величин, характеризующих восстанавливающие свойства.

По данным ИК спектроскопии, образец ГК-2 отличается от ГК-1 более высокими значениями отношений ОППП-величин, показывающих содержание ароматических фрагментов и фенольных групп, а также меньшими значениями отношений ОППП-величин, характеризующих содержание простых эфиров и углеводов.

По данным ^{13}C ЯМР спектроскопии, образец ГК-2 отличается от ГК-1 большим содержанием (более чем в 2 раза) в его молекулярной структуре углерода кетонных и хиноидных групп. В образце ГК-1 замещенный ароматический углерод представлен в большей степени алкил-арилowymi группировками (CH_3O -группами лигниновой природы), а в образце ГК-2 – фенольными фрагментами. В молекуле ГК-1 установлено также более высокое (на 30 %) содержание углеводных (полисахаридных) компонентов в сравнении с ГК-2, что в большей степени отражает его лигнинопроизводный характер.

По данным эксклюзионной ВЭЖХ, образец ГК-2 отличается от ГК-1 более чем в 2 раза низким значением средневесовой молекулярной массы и является веществом с более однородным молекулярным составом.

Таблица 2 – Дифференциальные параметры структуры ГК

Оптические свойства гуминовых кислот

Шифр ГК	Электронная спектроскопия			Флуоресцентная спектроскопия						
	E ₄₆₅	E ₆₅₀	Q _{4/6}	λ _{max} , нм			«Синий сдвиг»			
				270	310	355	² Δ1, нм	³ Δ2, нм	⁴ НІХ	
¹ ГК-1	0,1202± 0,0021	0,0411± 0,0005	2,9246± 0,0420	473,5±0,8	430,5±0,1	477,5±0,5	43,0±0,5	47,0±0,5	0,81	
¹ ГК-2	0,1284± 0,0023	0,0398± 0,0005	3,2261± 0,0498	478,5±0,8	430,0±0,1	478,0±0,5	48,0±0,5	48,5±0,5	1,01	
⁵ Отношения оптических плотностей полос поглощения при определенных волновых числах по данным ИК спектроскопии кислородсодержащих функциональных групп (ν _{ОН} 3400 см ⁻¹ , ν _{С=О} 1720 см ⁻¹ , ν _{С-О} , С-О-С 1225 см ⁻¹ , ν _{С-О} 1035 см ⁻¹) к ароматическим (ν _{С=С} 1610 см ⁻¹) и алифатическим (ν _{Aliphatic} 2920 см ⁻¹) фрагментам										
Шифр ГК	A ₃₄₀₀ / A ₁₆₁₀	A ₁₇₂₀ / A ₁₆₁₀	A ₁₂₂₅ / A ₁₆₁₀	A ₁₀₃₅ / A ₁₆₁₀	A ₁₆₁₀ / A ₂₉₂₀	A ₃₄₀₀ / A ₂₉₂₀	A ₁₇₂₀ / A ₂₉₂₀	A ₁₂₂₅ / A ₂₉₂₀	A ₁₀₃₅ / A ₂₉₂₀	A ₁₀₃₅ / A ₁₇₂₀
¹ ГК-1	0,70	0,96	0,98	096	1,40	0,98	1,30	1,35	1,20	0,90
¹ ГК-2	0,75	0,98	1,00	0,90	1,60	0,97	1,21	1,25	1,07	0,85
⁶ Элементный (С, Н, N, O, S) состав, атомные отношения элементов и средняя степень окисления атома углерода по Ю.А. Жданову в молекулах гуминовых кислот										
Шифр ГК	Массовые доли элементов, % (% _{mass})					Атомные отношения			ω	
	Атомные доли элементов, % (% _{atom})									
	С	Н	N	O	S	Н/С Н/С усnp	O/C	C/N		
¹ ГК-1	55,43±0,50 36,19±0,44	5,80±0,04 45,13±0,34	3,75±0,02 2,12±0,02	33,79±0,41 16,56±0,18	0	1,25 1,48	0,46	17,07	-0,16	
¹ ГК-2	55,35±0,50 35,88±0,42	5,86±0,05 45,21±0,33	4,20±0,03 2,33±0,02	34,30±0,44 16,65±0,24	0	1,26 1,49	0,46	15,40	-0,14	
Молекулярно-массовое распределение гуминовых кислот										
Шифр ГК	Параметры ММР									
	Среднечисленная Мм, Да (M _n)			Средневесовая Мм, Да (M _w)		Медиана, Да (M _p)		Полидиспер- сность (p)		
¹ ГК-1	21164,8			261519,4		74397,6		12,4		
¹ ГК-2	11844,2			121393,4		37918,4		10,3		
⁷ Распределение углерода по фрагментам структуры молекул гуминовых кислот										
Шифр ГК	Спектральные области, м.д.							Дескрипторы строения		
	5-48	48-90	90-108	108-145	145-165	165-187	187-220	⁹ Σ C _{Carb}	¹⁰ Σ C _{Ar} /Σ C _{Al}	
¹ ГК-1	19,9	20,5	6,6	25,3	7,4	16,0	4,2	27,1	20,5	
¹ ГК-2	24,9	17,2	3,3	25,0	5,4	15,6	8,6	0,67	0,67	
Примечание										
1 ГК-1 – гуминовые кислоты торфа болота «Клюквенное»; ГК-2 – гуминовые кислоты торфа болота «Таган»;										
2 Δ1, нм – сдвиг положения λ _{max} (310) относительно λ _{max} (270), Δ1 = λ _{max} (270) – λ _{max} (310)										
3 Δ2, нм – сдвиг положения λ _{max} (310) относительно λ _{max} (355), Δ2 = λ _{max} (355) – λ _{max} (310)										
4 НІХ – индекс гумификации										
5 отношения оптических полос поглощения рассчитаны исходя из средних значений (n=3)										
6 массовые и атомные доли элементов рассчитаны на беззолную навеску, атомные отношения элементов, средняя степень окисления атома углерода (ω) рассчитаны исходя из средних значений (n=3)										
7 Интегральные значения распределение протонов по областям химического сдвига рассчитаны исходя из средних значений (n=5)										
8 5-48 (СНn, С-С); 48-90 (R-O, С-O, N-alkyl); 90-108 (O-C-O; O-C-N); 108-145 (C _{Ar} (C=C, C=C-C)); 145-165 (C _{Ar} -O/N (C=C-O/N)); 165-187 (O=C-(OH/O/NH ₂))										
9 сумма карбогидратов (48-108 м.д.)										
10 степень ароматичности										

Таким образом, по результатам физико-химического анализа параметров строения и свойств, отмечено, что образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») является наиболее перспективным для получения биологически активных веществ гуминовой природы с целью разработки на его основе растительных лекарственных средств поскольку содержит более высокое количество азота, а также фенольных и хиноидных групп, меньшее количество CH_3O -групп лигниновой природы и углеводных (полисахаридных) компонентов, характеризуется более высоким индексом гумификации, меньшей степенью конденсированности ароматических структур и более высокими восстанавливающими свойствами, является менее полидисперсным, а также более легко поляризуемым и реакционно способным соединением.

ГЛАВА 4 ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПЕРСПЕКТИВНОГО ОБЪЕКТА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ НИЗИННОГО ДРЕВЕСНО-ТРАВЯНОГО ВИДА ТОРФА БОЛОТА «ТАГАН»

Исследование влияния перспективного объекта гуминовых кислот на скорость коронарной перфузии и сократительную активность изолированного сердца крыс в динамике концентраций. При перфузии интактных сердец крыс-самцов в условиях нормоксии изотоническим раствором Кребса-Хензелята с растворенным в нем перспективным образцом ГК-2 в концентрации 0,001 мг/кг; 0,01 мг/кг и 0,1 мг/кг, было установлено, что образец ГК-2 проявляет прямые вазоактивные эффекты. Образец ГК-2 в концентрации 0,1 мг/мл в наибольшей степени изменяет функциональное состояние сердечной мышцы. Поэму в дальнейших испытаниях использовали ГК в данной дозе.

Исследование кардиопротекторного и инотропного действия гуминовых кислот при ишемии и реперфузии изолированного сердца и возможных механизмов кардиотропного действия. По результатам исследования можно заключить, что применение ГК-2 в период, предшествующей гипоксии-реоксигенации, способствует повышению устойчивости миокарда к данным патологическим условиям (Таблица 3). Это подтверждается восстановлением его сократимости (Таблица 3), снижением некротической гибели кардиомиоцитов (снижение реперфузионного выброса КФК с $51,1 \pm 3,4$ мкмоль НАДН/мин*л в контрольной группе до $42,3 \pm 3,2$ мкмоль НАДН/мин*л в опытной группе ($p < 0,05$)). При этом одним из механизмов реализации цитопротекции является активация гуминовыми кислотами NO-сигнального пути (Таблица 4).

Таблица 3 – Влияние перспективного образца ГК-2 в концентрации 0,1 мг/мл на давление, развиваемое левым желудочком, частоту сердечных сокращений, конечное диастолическое давление

Время	¹ ДРЛЖ (мм рт. ст.) (n=14)		² ЧСС (уд/мин) (n=14)		³ КДД (мм рт. ст.) (n=14)	
	Контроль	Образец ГК-2	Контроль	Образец ГК-2	Контроль	Образец ГК-2
20-я мин адаптации	91,3±5,8	93±3,2	196,1±10,3	187,8±3	15,6±0,3	15,3±0,3
10-я мин перфузии	96,9±3,9	⁵ 70,8±4,3	179,6±8,5	⁴ 158,2±3,8	13,6±0,22	⁴ 12,4±0,45
Реперфузия, мин						
5 мин	⁷ 6,4±1	^{4,7} 15,6±4,8	⁷ 87,5±11,2	⁷ 61,9±7,5	⁷ 79,2±7,1	^{4,7} 65,8±1,4
15 мин	⁷ 8,3±1,8	^{4,7} 20±4,1	⁶ 152,6±13,5	^{5,6} 78,9±13,3	⁷ 75,8±5,4	^{4,7} 60,1±7,1
30 мин	⁷ 21,2±3	^{4,7} 31,1±3,4	⁶ 156,3±16,7	^{5,6} 87,3±11,1	⁷ 64±8,2	⁷ 59,8±4,5
Примечания						
1 ДРЛЖ – давление, развиваемое левым желудочком						
2 ЧСС – частота сердечных сокращений						
3 КДД – конечное диастолическое давление						
4 достоверно относительно аналогичных значений в контроле p<0,05						
5 достоверно относительно аналогичных значений в контроле p<0,01						
6 достоверно относительно исходных значений в группе p<0,01						
7 достоверно относительно исходных значений в группе p<0,001						

Таблица 4 – Влияние блокатора NO-синтазы L-NAME и перспективного образца ГК-2 на показатели сократимости изолированного сердца крыс

Давление, развиваемое левым желудочком, мм рт. ст.					Конечное диастолическое давление, мм рт. ст.			
Экспозиция	Конт-роль, n=14	Образец ГК-2, 0,1 мг/кг	L-NAME, 100 мкМ/л	Образец ГК-2 + L-NAME	Конт-роль, n=14	Образец ГК-2	L-NAME	Образец ГК-2 + L-NAME
Перфузия, мин								
20 мин	91±5,8	93±3,2	92±2,2	90,9±6,1	15,6±0,3	15,3±0,3	15,7±0,6	14±0,3
10 мин	90,9±4	¹ 70,8±4	87±5,2	90,8±6,9	13,6±0,2	¹ 12,4±0,5	14,7±0,8	13,4±0,9
Реперфузия, мин								
5 мин	⁵ 10,3±2,7	^{1,5} 37,4±11	⁵ 10,2±3	⁵ 12,2±4,4	⁵ 79,2±7,1	⁵ 65,8±1,4	⁵ 79±3,6	⁵ 77±3,6
15 мин	⁵ 18,5±2,4	^{1,5} 45,3±9	⁵ 16,5±2,4	⁵ 19,5±3,8	⁵ 75,8±5,4	^{1,5} 60±7,1	76±6,6	⁵ 74±6,3
30 мин	⁵ 25,7±3	^{1,5} 37,7±4,2	⁵ 20,7±3	⁵ 28,4±3,5	⁵ 64±8,2	⁵ 59,8±4,5	⁵ 65,9±5	⁵ 62,9±8
1 достоверно относительно аналогичных значений в контроле p<0,05								
2 достоверно относительно аналогичных значений в контроле p<0,01								
3 достоверно относительно исходных значений в группе p<0,05								
4 достоверно относительно исходных значений в группе p<0,01								
5 достоверно относительно исходных значений в группе p<0,001								

Исследование антиоксидантной активности (АОА) образца ГК-2 с помощью четырех физико-химических методов анализа (катодной вольтамперометрии, ЭПР-спектроскопии, колориметрии с ДФПГ и феррозином) позволило выявить у него высокие АО свойства (Таблицы 5-6, Рисунки 3-4).

Возможным механизмом антирадикальной активности (АРА) ГК-2 по данным колориметрии с ДФПГ может являться их способность выступать в роли доноров протона благодаря наличию большого количества фенольных групп. Феррозин-тест показал наличие у ГК-2 хелатирующих свойств относительно Fe^{2+} . Также отмечается, что перспективный образец ГК-2 является редокс-активным соединением, проявляющим каталитическую активность по отношению к процессу ЭВ O_2 , возможный механизм АОА может быть связан со способностью хиноидных группировок участвовать в процессе

ЭВ О₂ благодаря фенольным фрагментам. По данным ЭПР-спектроскопии к предполагаемому механизму АРА ГК относится их способность выполнять роль своеобразных «ловушек» радикальных частиц, т.к. характеристика ЭПР-спектров (интенсивность сигнала, ширина синглетной линии, g-фактор спектроскопического расщепления) идентична свободному радикалу семихинонного типа ($g=2,0023$).

Таблица 5 – Параметры оценки антиоксидантной и антирадикальной активности перспективного образца ГК-2

Вещество	¹ ДФПГ, %	² $\tau_{1/2}$, мин	³ IC ₅₀ , мкг/мл	⁴ K, мкмоль/л*мин	Параметры спектров ЭПР	
					⁵ ΔH , мТл	⁶ ПМЦ ($\times 10^{16}$ спин/г)
ГК-2	73,21	2	28	0,53 $\pm$ 0,04	0,50	5,81
Дигидрокверцетин	95,21	2		0,78 $\pm$ 0,08	–	–

Примечания

1 ДФПГ, % – процент ингибирования радикала ДФПГ (по данным колориметрии с ДФПГ)

2 $\tau_{1/2}$, мин – время реакции ДФПГ веществами на 50% (по данным колориметрии с ДФПГ)

3 IC₅₀ – величина, показывающая концентрацию ГК при которой достигается уровень ингибирования в 50 %

4 K, мкмоль/л*мин – каталитическая активность (по данным вольтамперометрии)

5 ΔH , мТл – ширина синглетной линии (по данным ЭПР спектроскопии)

6 ПМЦ ($\times 10^{16}$ спин/г) – концентрация парамагнитных центров (по данным ЭПР спектроскопии)

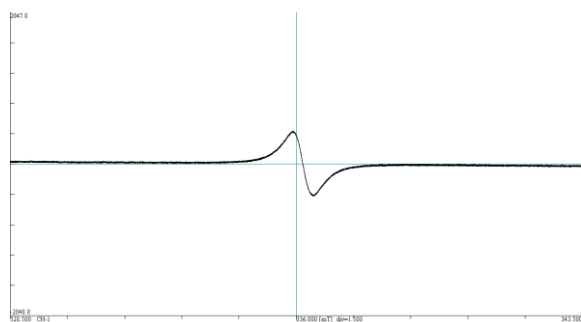


Рисунок 3 – ЭПР-спектр перспективного образца ГК-2, $g=2,0035$

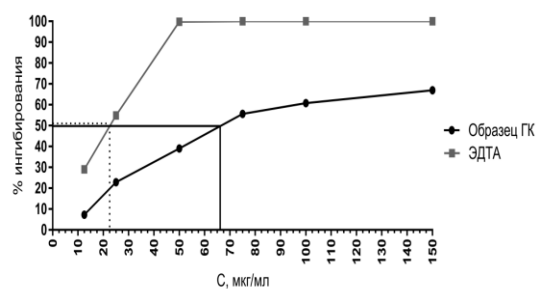


Рисунок 4 – Кинетические кривые реакции ингибирования гуминовыми кислотами (ГК-2) и ЭДТА образования комплекса феррозин-Fe²⁺

Таблица 6 – Железосвязывающая активность перспективного образца ГК-2 по данным колориметрии с феррозином

Объект исследования	Ингибирующая активность (Ing, %) в концентрациях (мкг/мл):						IC ₅₀
	12,5	25	50	75	100	150	
Образец ГК-2	7,33 $\pm$ 0,8	22,87 $\pm$ 0,63	39,00 $\pm$ 1,78	55,60 $\pm$ 0,30	60,83 $\pm$ 0,52	66,98 $\pm$ 0,70	66,0
Препарат сравнения – ЭДТА	29,06 $\pm$ 0,37	54,87 $\pm$ 0,22	99,77 $\pm$ 0,22	100	100	100	22,5

Примечание

IC₅₀ – концентрация вещества при которой достигается уровень ингибирования в 50% (мкг/мл)

Исследование актопротекторной активности гуминовых кислот. Пятидневное введение образца ГК-2 и предъявление животным плавательного теста до состояния полного утомления сопровождалось повышением их работоспособности и резистентности к физической нагрузке и не изменяло содержания лактата в сыворотке крови животных (Таблица 7).

Таблица 7 – Результаты исследования актопротекторной активности перспективного образца ГК-2

Группа животных	Интактная (n=10)	Контрольная группа № 1 (n=10)	Контрольная группа № 2 (n=10)	Опытная группа (n=10)
Дни плавания	Продолжительность плавания (с), ¹ Me (² Q ₁ ; ³ Q ₃)			
1	Не плавали	38 (34;49)	64 (55;84) p=0,038	70 (57;95) p=0,005
2		46 (45;57) ⁴ p ₀ =0,01	61 (80;68)	76 (57;195) p=0,005
3		53 (44;67) ⁴ p ₀ =0,007	65 (62;76)	101 (66;114) ⁴ p ₀ =0,02, p ₁ =0,05
4		52 (37;58) ⁴ p ₀ =0,007	69 (57;87)	97 (77;133) ⁴ p ₀ =0,007, p ₁ =0,05
5		47 (40;68) ⁴ p ₀ =0,04	63 (41;71)	97 (61;113) ⁴ p ₀ =0,03, ⁵ p ₁ =0,04
Уровень лактата на 5 день эксперимента (ммоль/л): ¹ Me (² Q ₁ ; ³ Q ₃)				
ГК-2	3,7 (2,4;4,1)	4,5 (4,4;5,1) p _и =0,02	3,1 (2,8;3,7) P _{к1} =0,007	3,5 (3,3;3,8) P _{к1} =0,004
Примечания 1 Me – медиана; 2 Q ₁ – квартиль, 25%; 3 Q ₃ – квартиль, 75%; 4 p ₀ – уровень статистической значимости к первому предъявлению плавательного теста внутри соответствующей группы 5 p ₁ – уровень статистической значимости к соответствующей контрольной группы				

Таким образом, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* доказано, что образец ГК-2 (выделенный из низинного древесно-травяного вида торфа с болота «Таган») является перспективным БАВ для разработки малотоксичных лекарственных средств растительного происхождения, способных оказывать кардиопротекторное, антиоксидантное и актопротекторное действие для целей вспомогательной терапии ишемической болезни сердца, для повышения физической работоспособности и выносливости человека, а также для использования у лиц, специализирующихся в различных видах спорта или занятых тяжелым физическим трудом, в том числе в экстремальных условиях.

Полученные результаты являются основанием для разработки нормативной документации для образца ГК-2 как БАВ и его сырьевого источника – низинного древесно-травяного вида торфа.

ГЛАВА 5 РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ (БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ГУМИНОВОЙ ПРИРОДЫ) И ИХ СЫРЬЕВОГО ИСТОЧНИКА (ТОРФА)

Для сырьевого источника ГК-2 – низинного древесно-травяного вида торфа предложены показатели подлинности и качества: микроскопические показатели, числовые показатели, количественное содержание ГК в сырье (торфе). Для перспективного образца ГК-2 предложены показатели подлинности и качества: идентификация и числовые показатели по данным электронной, флуоресцентной, ИК и ^{13}C -ЯМР спектроскопии, элементного (С, Н, N, О)-анализа, эксклюзионной ВЭЖХ, валидированная методика количественного определения ГК в растворах спектрофотометрическим методом, альтернативный путь биологической стандартизации – определение радикалосвязывающей активности колориметрическим методом с ДФПГ. На основании разработанных методик и подходов к стандартизации ГК и их сырьевого источника (торфа) предложены два проекта нормативной документации: «Торф низинный древесно-травяной» и «Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Два образца древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган») по результатам фармакогностического исследования являются очень близкими по своему происхождению. Наиболее предпочтительным для целей выделения гуминовых кислот является образец торфа с месторождения «Таган», т.к. отличается более высокой степенью разложения, меньшей зольностью и меньшей загрязненностью минеральными примесями.

2. Для двух образцов гуминовых кислот из древесно-травяных видов торфа с разных торфяных месторождений Томской области («Клюквенное» и «Таган») выявлен ряд общих и индивидуальных элементов структуры и свойств. Специфическими (дифференциальными) параметрами структуры, позволяющими проводить оценку их качества являются: спектральные коэффициенты по данным электронной спектроскопии, положения максимумов флуоресценции и величины гипсохромного сдвига спектров флуоресценции, значения отношений ОППП-величин по данным ИК-спектроскопии, содержание кислотных функциональных групп, массовые и атомные доли элементов в процентах, значения атомных отношений элементов и средней степени окисления атома углерода, интегральные соотношения спектральных областей атомов углерода различных фрагментов структуры по данным ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, показатели молекулярно-массового распределения по данным эксклюзионной ВЭЖХ.

3. По результатам физико-химического анализа параметров строения и свойств в качестве перспективного обоснован образец ГК-2 (выделенный из торфа с болота «Таган») поскольку содержит более высокое количество азота, фенольных и хиноидных

групп, меньшее количество CH_3O -групп лигниновой природы и углеводных (полисахаридных) компонентов, характеризуется более высоким индексом гумификации, меньшей степенью конденсированности ароматических структур и более высокими восстанавливающими свойствами, является менее полидисперсным, а также более легко поляризуемым и реакционно способным соединением.

4. Выявлены прямые кардиоваскулярные эффекты перспективного образца ГК-2 при перфузии изолированных крысиных сердец по методу Лангендорфа, его превентивное применение перед моделированием тотальной ишемии способствует восстановлению инотропной функции сердечной мышцы, ослаблению постишемической контрактуры, повышению сократимости. Кардиопротекторные эффекты связаны с цитопротективной активностью, объясняемой снижением уровня креатинфосфокиназы в перфузате. Цитопротекторное действие является следствием высоких антиоксидантных свойств, доказанных с помощью четырех физико-химических методов анализа, а также влиянием на NO-сигнальный путь передачи сигнала. Хроническое пятидневное применение перспективного образца ГК-2 перед предъявлением животным физической нагрузки (в виде плавательного теста), пролонгировало момент наступления утомления, не вызывая повышения уровня лактата в крови, что свидетельствует об актопротекторной активности.

5. По результатам разработанных методик для стандартизации гуминовых кислот и их сырьевого источника (торфа) предложены два проекта нормативной документации: «Торф древесно-травяной низинный» и «Гуминовые кислоты низинного древесно-травяного торфа».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Рецензируемые научные издания, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук (по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия):

1. Антиоксидантная активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы / М.В. Зыкова, Л.А. Логвинова, С.В. Кривошеков, О.А. Воронова, Т.В. Ласукова, К.А. Братишко, Г.А. Жолобова, О.А. Голубина, И.А. Передерина, Л.А. Дрыгунова, Е.Н. Тверякова, М.В. Белоусов // **Химия растительного сырья.** – 2018. – № 3. – С. 239–250.
2. Зыкова, М.В. Высокомолекулярные соединения гуминовой природы – перспективные биологически активные соединения / М.В. Зыкова, Л.А. Логвинова, М.В. Белоусов // **Традиционная медицина.** – 2018. – № 2 (53). – С. 27–38.
3. Physicochemical characterization and antioxidant activity of humic acids isolated from peat of various origins / M.V. Zyкова, I.A. Schepetkin, M.V. Belousov, S.V. Krivoshchekov, L.A. Logvinova, K.A. Bratishko, M.S. Yusubov, S.V. Romanenko, M.T. Quinn // **Molecules.** – 2018. – Vol. 23. N 4. – P. 753–768.
4. Роль NO-синтазы в реализации кардиопротективного эффекта соединений гуминовой природы на модели ишемии и реперфузии изолированного сердца крыс / Т.В. Ласукова, М.В. Зыкова, М.В. Белоусов, А.С. Горбунов, Л.А. Логвинова, А.М. Дыгай // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2018. – Т. 166, № 11. – С. 537–540.
5. Кардиоваскулярные эффекты высокомолекулярных соединений гуминовой природы / М.В. Зыкова, М.В. Белоусов, Т.В. Ласукова, А.С. Горбунов, Л.А. Логвинова, А.М. Дыгай // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2017. – Т. 163, № 2. – С. 167–170.
6. Спектральные параметры и биологическая активность высокомолекулярных соединений гуминовой природы / М.В. Зыкова, Е.С. Трофимова, С.В. Кривошеков, А.А. Лигачева, М.Г. Данилец,

Л.А. Логвинова, Г.А. Жолобова, О.Ф. Прищепова, М.С. Юсубов, М.В. Белоусов / Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – № 16 (1). – С. 36–49.

Другие научные издания:

7. Подходы к стандартизации торфа как сырьевого источника гуминовых веществ / К.А. Братишко, М.В. Зыкова, С.В. Кривошеков, **Л.А. Логвинова** и др. // Сборник статей XI Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Химия и технология растительных веществ» – Сыктывкар, 2019 – С. 223–224.
8. Фармацевтический потенциал гуминовых кислот торфа / М.В. Зыкова, М.Г. Данилец, **Л.А. Логвинова**, О.А. Голубина, М.В. Белоусов // Сборник материалов II Международной научной конференции «Современное состояние чернозёмов» (в 2х томах). – Ростов-на-Дону, 2018. Том 2. – С. 328–336.
9. Возможные механизмы антиоксидантного действия гуминовых кислот / К.А. Братишко, М.В. Зыкова, С.В. Кривошеков, **Л.А. Логвинова**, М.В. Белоусов // Сборник статей IV Гаммермановских чтений. – Москва, 2018. – С. 41–45.
10. Кардиоваскулярные эффекты гуминовых кислот торфа / **Л.А. Логвинова**, М.В. Зыкова, Т.В. Ласукова, М.В. Белоусов // Сборник статей IV Гаммермановских чтений. – Москва, 2018. – С. 198–201.
11. Разработка подходов к контролю качества гуминовых кислот / **Л.А. Логвинова**, М.В. Зыкова, С.В. Кривошеков, О.А. Голубина, М.В. Белоусов // Сборник материалов VII Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения профессора Д.С. Орлова и III Международной научной школы «Методы оценки биологической активности гуминовых продуктов». – Москва, 2018. – С. 126–127.
12. Антиоксидантная активность специфических веществ сибирских торфов (по данным физико-химического исследования) / К.А. Братишко, М.В. Зыкова, С.В. Кривошеков, **Л.А. Логвинова**, М.В. Белоусов // Сборник докладов XXV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – Москва, 2018. – С. 136.
13. Effects of humic acids of the peat on the coronary reperfusion and the contractive activity of isolated heart of rats / **L. Logvinova**, M. Zyкова, T. Lasukova, S. Krivoshekov, E. Veretennikova, M. Belousov // Fourth International Conference of CIS IHSS on Humic Innovative Technologies «From Molecular Analysis of Humic Substances - to Nature-like Technologies» (HIT-2017). – Moscow, 2017. – P. 20–21.
14. Влияние гуминовых кислот торфа на скорость коронарной перфузии и сократительную активность изолированного сердца крыс / М.В. Зыкова, Т.В. Ласукова, **Л.А. Логвинова**, М.В. Белоусов // Сборник докладов XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – Москва, 2017 г. – С. 97.
15. Исследование кардиотропной активности гуминовых кислот торфа / Е.В. Калашникова, **Л.А. Логвинова**, К.В. Бочарова, И.П. Слезко, К.А. Братишко // Сборник докладов XXI международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Наука и образование». – Томск, 2017. – С. 117–120.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность за помощь в работе научному руководителю доктору фармацевтических наук, доценту М.В. Зыковой, консультанту доктору биологических наук, доценту Т.В. Ласуковой, заведующему кафедрой фармацевтического анализа СибГМУ, доктору фармацевтических наук, доценту М.В. Белоусову, старшему преподавателю кафедры фармацевтического анализа СибГМУ, кандидату химических наук С.В. Кривошекову, научному сотруднику экспериментальной лаборатории биомедицинских технологий Филиала ТНИИ курортологии и физиотерапии ФГБУ СибФНКЦ ФМБА России, кандидату биологических наук А.А. Гостюхиной.