(51) MIIK

## ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

### (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014102567/15, 27.01.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 27.01.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.01.2014

(45) Опубликовано: 10.04.2015 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о

поиске: (см. прод.)

Адрес для переписки:

188663, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, ОС Кузьмолово, а/я 5, Аверьянову Е.К.

(72) Автор(ы):

Горбатова Виктория Викторовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Закрытое акционерное общество

"Фармацевтическое предприятие

"МЕЛИГЕН" (RU)

# (54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НАСТОЙКИ СЕМЯН СОСНЫ КЕДРОВОЙ СИБИРСКОЙ И ГЕПАТОЗАЩИТНЫЙ ПРЕПАРАТ, ПОЛУЧЕННЫЙ ТАКИМ СПОСОБОМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу получения настойки, обладающей гепатопротекторным, антигипоксическим, антиоксидантным, гиполипидемическим действием. Способ обладающей получения настойки. антиоксидантным. гепатопротекторным, антигипоксическим, гиполипидемическим действием, из семян сосны кедровой сибирской мацерацией с использованием этилового спирта, при этом цельные семена сосны кедровой сибирской загружают в реактор, заливают 70% водным раствором этилового спирта, экстрагирование проводят при определенных условиях. Лекарственный препарат, обладающий гепатопротекторным, антиоксидантным, антигипоксическим, гиполипидемическим действием, содержащий настойку семян сосны кедровой сибирской. Применение лекарственного препарата в качестве гепатозащитного средства. Настойка, полученная вышеописанным способом, обладает выраженным гепатопротекторным, антиоксидантным, антигипоксическим, гиполипидемическим действием. 3 н. и 3 з.п. ф-лы, 3 ил., 8 табл.

S

S

(56) (продолжение):

RU 2170097 C2, 10.07.2001\par RU 2373266 C1, 20.11.2009\par RU 2458698 C2, 20.08.2012\par WO 2013141831 A1, 26.09.2013

45700 C

⊃

~

S

2

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

 $^{(19)}$  RII $^{(11)}$ 

**2 545 700**<sup>(13)</sup> **C1** 

(51) Int. Cl.

**A61K 36/15** (2006.01)

**A61K** 131/00 (2006.01)

**B01D** 11/02 (2006.01) **A61P** 1/16 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2014102567/15, 27.01.2014

(24) Effective date for property rights: 27.01.2014

Priority:

(22) Date of filing: 27.01.2014

(45) Date of publication: 10.04.2015 Bull. № 10

Mail address:

188663, Leningradskaja obl., Vsevolozhskij r-n, OS Kuz'molovo, a/ja 5, Aver'janovu E.K. (72) Inventor(s):

Gorbatova Viktorija Viktorovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Zakrytoe aktsionernoe obshchestvo
"Farmatsevticheskoe predprijatie "MELIGEN"
(RU)

(54) METHOD FOR PRODUCTION OF SIBERIAN CEDAR SEEDS LIQUEUR AND HEPATOPROTECTIVE PREPARATION PRODUCED BY SUCH METHOD

(57) Abstract:

FIELD: food industry.

SUBSTANCE: method for production of Siberian cedar seeds liqueur (with hepatoprotective, antioxidant, antihypoxic, hypolipidemic effect) by way of maceration with ethyl alcohol usage; whole Siberian cedar seeds are loaded into the reactor, poured with 70% ethyl alcohol water solution; extraction is performed under preset conditions. The medicinal

preparation with hepatoprotective, antioxidant, antihypoxic, hypolipidemic effect contains Siberian cedar seeds liqueur. Usage of the medicinal preparation as a hepatoprotective remedy.

S

G

7

0

EFFECT: liqueur has pronounced hepatoprotective, antioxidant, antihypoxic and hypolipidemic effect.

6 cl, 3 dwg, 8 tbl

ر 2

2545700

=

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и может быть использовано для получения лекарственного препарата настойки семян сосны кедровой сибирской и его применения в качестве гепатозащитного средства.

В многочисленных исследованиях (Лизунов В.В. Кедровые орехи как промышленное масличное сырье. - Автореф. канд. техн. наук. - М., - 1969. - 23 с.; Донская Л.И., Музалевская О.В. / Растительные ресурсы. - 1994. - вып. 3. - С. 64-66; Утсаль В.А., Пименов А.И., Макаров В.Г., Краснов К.А., Стрельникова Е.П., Прохорова Л.В., Евтушенко Н.С. К вопросу о химическом составе экстрактов из оболочки семян сосны кедровой сибирской // II Межд. съезд "Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения": Матер. Санкт-Петербург, 1998. - 214 с.; Стрельникова Е.П., Прохорова Л.В. Семена сосны кедровой сибирской - компонент эликсиров. В кн. Эликсиры под ред. Макарова В.Г., Санкт-Петербург. - 1996. - С.87-106; Каретников П.В., Дмитриченко М.М. О содержании некоторых микроэлементов в кедровых орехах // Вопросы питания. - 1966. - Т.25. - №5. - С.79-80) установлено, что в семенах сосны кедровой сибирской содержатся такие важные химические соединения, как флавоноиды, лигнаны, неэтерифицированные жирные кислоты, убихинон, аминокислоты и другие, обладающие ценными биологическими активностями (антиоксидантной, антигипоксической, противовоспалительной, репаративной, гиполипидемической и др.). Кроме того, содержащиеся в семенах сосны кедровой сибирской минеральные вещества и витамины, выполняющие важнейшие функции в организме (коферментные, регуляцию внутриклеточной сигнализации, обмен веществ, нервную и мышечную активность), вносят дополнительный вклад в фармакологическую активность семян. Это послужило основанием для разработки способа получения настойки и препарата, представляющего собой водно-спиртовое извлечение семян сосны кедровой сибирской.

Известны способы приготовления водно-спиртовых настоек из кедровых орехов и скорлупы кедровых орехов (патенты РФ №2471862, №2016891, №2420563), применяемых в ликеро-водочной промышленности.

Известен способ приготовления лечебной спиртовой настойки по патенту РФ №2170097 (наиболее близкий аналог) из смеси измельченного сырья кедрового ореха и 40-50% спирта при соотношении сырье: спирт 6-10:100. Однако уровень разработки способа является недостаточным для его промышленной реализации, а выход целевого продукта непредсказуемым и низким.

Задачей изобретения является разработка способа получения лечебной настойки семян сосны кедровой сибирской с высокой фармакологической активностью и получение лекарственного препарата, обладающего гепатозащитными свойствами.

Для этого в способе получения настойки семян сосны кедровой сибирской с использованием этилового спирта цельные семена сосны кедровой сибирской загружают в реактор, заливают экстрагентом в соотношении семена : экстрагент 1:5, причем в качестве экстрагента используют 70% водный раствор этилового спирта, экстрагирование проводят в течение 10-15 суток при комнатной температуре с ежедневным перемешиванием, получают настойку с содержанием спирта не менее 65% и сухого остатка не менее 0,5%, настойку отстаивают и отделяют осадок для получения готового продукта.

техническим результатом является повышение эффективности извлечения целевых компонентов, обладающих лечебными свойствами.

В частном случае, соотношение семена : экстрагент 1:5 обеспечивают с учетом коэффициента поглощения 1,15.

В другом частном случае, настойку получают с содержанием суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту не менее 0,05%.

В другом частном случае, настойку отстаивают не менее двух суток при температуре 8-10°C, обеспечивая отсутствие видимой взвеси.

В другом частном случае, осадок отделяют фильтрацией или декантацией.

Лекарственный препарат настойки семян сосны кедровой сибирской, полученной заявляемым способом, обладает гепатопротекторным действием. Кроме того, установлена значительная антиоксидантная активность, антигипоксическая активность и гиполипидемическое действие препарата.

Графические материалы, поясняющие сущность изобретения, представлены на фигурах:

Фиг.1 - кинетика экстрагирования фенольных соединений (А) и сухого остатка (Б) при получении настойки семян сосны кедровой сибирской.

Фиг.2 - технологическая схема получения настойки семян сосны кедровой сибирской. На схеме сделаны следующие обозначения:  $K_{\rm T}$ ,  $K_{\rm x}$ ,  $K_{\rm MK\delta}$  - контроль технический, химический и микробиологический соответственно.

Фиг.3A - печень интактной крысы. Окраска гематоксилинэозин, увеличение × 100. Типичное упорядоченное строение долек.

Фиг. 3Б - хронический токсический стеатогепатит с выраженной активностью. Печень крысы через 2 месяца хронического эксперимента, получавшей ССІ<sub>4</sub>. Окраска гематоксилинэозин, увеличение × 100. Выраженный склероз потральных трактов, проникновение соединительной ткани в дольки, крупнокапельная жировая дистрофия, жировые некрозы гепатоцитов, выраженная воспалительная инфильтрация ткани печени.

Фиг. 3В - хронический токсический стеатогепатит с минимальной активностью. Печень крысы через 2 месяца хронического эксперимента, получавшей  $CCl_4$  и настойку семян сосны кедровой в дозе 1,4 мг/кг. Окраска гематоксилинэозин, увеличение  $\times$  100. Слабовыраженный склероз и воспалительная инфильтрация в портальных трактах, единичные некрозы гепатоцитов в поле зрения, мелкокапельная жировая дистрофия в перипортальных зонах.

При разработке способа экстрагирования была проведена предварительная оценка содержания в препарате абиетиновой кислоты, пиноцембрина и пиностробина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Спектрофотометрическим методом по продуктам реакции с нингидрином в присутствии ацетата натрия оценивали содержание нингидринактивных соединений в пересчете на аргинин (прежде всего аминокислот). Для оценки содержания основной группы действующих веществ препарата - фенольных соединений - использовано перманганатометрическое титрование в присутствии индигосульфокислоты (методика Государственной фармакопеи XI (ГФ XI)). Суммарное содержание фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту определяли спектрофотометрическим методом с использованием раствора стандартного образца галловой кислоты. Сухой остаток определяли по методике ГФ XI, вып.2, с.148. Для изучения перехода различных групп соединений из растительного сырья в вытяжку в качестве экстрагента исследовали 40 и 70% спирт этиловый. Экстрагирование проводили методом мацерации в соотношении сырье: экстрагент 1:5 в течение 10 суток в защищенном от света месте при ежедневном перемешивании. Данные количественного определения представлены в Таблице 1.

Таблица 1

5

25

Выбор концентрации экстрагента				
Параметры	40% спирт этиловый	70% спирт этиловый		
Сухой остаток, %	0,8	0,8		
Сумма окисляемых веществ в пересчете на танин, %	0,08	0,085		
Сумма фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту, %	0,76	0,78		
Сумма нингидринактивных соединений в пересчете на аргинин, %	0,23	0,15		
Пиноцембрин, мг/л	•••	6,3		
Пиностробин, мг/л	•••	2,7		
Абиетиновая кислота, мг/л	3,2	14,0		

5

10

25

Установлено, что содержание абиетиновой кислоты повышается в зависимости от увеличения концентрации спирта этилового в экстрагенте. В то же время на содержание основных исследованных групп биологически активных веществ концентрация спирта не оказывает существенного влияния. Выбор в качестве экстрагента 70% спирта позволяет извлечь из семян сосны кедровой сибирской комплекс соединений средней полярности, в составе которого можно предполагать наличие терпенов, фенольных соединений, возможно аминокислот, витаминов и жирных кислот.

Для изготовления настоек могут быть использованы различные технологии. Результаты аналитических исследований настаивания с перемешиванием (3 часа, скорость вращения мешалки 200 об/мин) показывают, что при таком экстрагировании происходит незначительное увеличение содержания суммы фенольных и окисляемых веществ. Исследование процесса ремацерации показало, что при данной технологии незначителен сухой остаток (Таблица 2). Это, вероятно, связано с тем, что недостаточно интенсивно происходят процессы набухания и диффузии из-за морфологического строения оболочки семян сосны кедровой сибирской.

Применение мацерации в течение 10 суток с ежедневным перемешиванием привело к одновременному повышению содержания сухих веществ при значительном количестве фенольных и окисляемых веществ.

	Таблица 2						
30	Обоснование технологии сосны кедровой настойки						
30		Технология					
	Параметр	Ремацерация	Настаивание с перемешива- нием	Мацерация			
	Сухой остаток, %	0,43±0,01	0,76	$0,80\pm0,06$			
	Сумма окисляемых веществ в пересчете на танин, %	0,064±0,002	0,028	0,085			
35	Сумма фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту, %	0,073±0,002	0,045	0,078±0,006			
	Сумма нингидринактивных соединений в пересчете на аргинин, %	0,13±0,01	0,11	0,15±0,01			

Для выяснения оптимальных условий процесса экстрагирования при получении настойки была изучена кинетика экстрагирования (Фиг.1). Предварительно определили содержание экстрактивных веществ из цельных семян сосны кедровой сибирской, извлекаемых 70% спиртом, по методике ГФ XI, вып.1, с.295. Установили, что процесс экстрагирования протекает в течение не менее 8 суток. Эффективность экстрагирования при этом составила около 90%.

Таким образом, на основании проведенных исследований был разработан предлагаемый способ получения настойки семян сосны кедровой сибирской, позволяющий получать препарат, удовлетворяющий требованиям ГФ XI издания и стабильный при хранении в течение не менее 2 лет.

В качестве примера осуществления изобретения ниже приведена технология (Фиг.2)

получения настойки семян сосны кедровой сибирской, применяемая на предприятии заявителя.

ВР.1. Подготовка производства

На всех стадиях технологического процесса организация производства должна осуществляться в соответствии с требованиями GMP и ИСО 9001:2000.

ВР.2. Вспомогательные работы

ВР.2.1. Подготовка воды

Воду для обеспечения показателей качества согласно нормам  $\Phi$ С 42-2619-97 подвергают дополнительной очистке.

ТП.3. Получение настойки

10

ТП.3.1. Приготовление экстрагента.

В качестве экстрагента используют 70% спирт этиловый. В реактор с помощью насоса закачивают рассчитанное количество воды очищенной, затем спирт этиловый 96%. Смесь перемешивают в течение 20 минут с помощью вакуумного насоса, затем отбирают пробу для определения крепости спирта. Концентрацию полученного экстрагента контролируют при помощи спиртомера. Полученный раствор спирта сливают в реактор на операцию

ТП.3.2. "Экстрагирование".

ТП.3.2. Экстрагирование

Настаивание проводят в реакторе с ложным днищем и съемной крышкой. Перед 20 началом работы проверяют соответствие наименования и номера серии сырья на упаковке данным аналитического паспорта. Заносят в рабочий журнал дату загрузки, № серии сырья, Ф.И.О. оператора, № аналитического паспорта, № серии настойки. Вручную загружают цельные семена сосны кедровой сибирской. Загруженное сырье распределяют ровным слоем. Данные о загрузке (количество сырья, времени загрузки) заносят в рабочий журнал. Затем заливают приготовленный раствор экстрагента (в соотношении 1:5) с учетом коэффициента поглощения 1,15. Экстрагирование проводят в течение 10-15 суток при комнатной температуре, ежедневно перемешивая. По истечении 10 суток отбирают пробу для определения содержания сухого остатка и суммы фенольных соединений. После получения положительного результата извлечение сливают. В случае получения заниженного сухого остатка или содержания действующих веществ настаивание продолжают еще в течение нескольких суток. После получения положительных данных анализа настойку сливают в приемник. Полученный после экстракции шрот собирают в приемник. Получают настойку с содержанием спирта не менее 65%, сухого остатка не менее 0,5% и содержанием суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту не менее 0,05%.

ТП.3.3. Отстаивание и отделение осадка

Затем полученную настойку отстаивают не менее 2-х суток при температуре 8-10°C. По истечении 48 часов отстаивания отбирают пробу и визуально проверяют отсутствие взвеси. При наличии взвеси отстаивание продолжают еще 24 часа. После получения удовлетворительных данных приступают к отделению осадка методом фильтрации. По окончании фильтрации еще раз отбирают пробу настойки для контроля на содержание спирта. Готовую настойку передают далее на стадию фасовки.

Характеристика специфической фармакологической активности настойки семян сосны кедровой сибирской

Анализ данных литературы и результаты ранее проведенных нами исследований свидетельствуют о том, что препараты, полученные на основе семян сосны кедровой сибирской (ядро и скорлупа), содержат богатый комплекс биологически активных

веществ и обладают широким спектром фармакологической активности. Так, эликсир Кедровит, преобладающим компонентом которого является водно-спиртовое извлечение из семян сосны кедровой сибирской, при экспериментальном и клиническом изучении показал выраженную гепатопротекторную, антиоксидантную, антигипоксическую, гиполипидемическую и кардиозащитную активности. Это и определило основную направленность фармакологических исследований полученного заявленным способом нового препарата спиртовая настойка цельных семян сосны кедровой сибирской "Сосны кедровой настойки" (СКН).

Так как в проекте фармакопейной статьи предприятия количественную стандартизацию "Сосны кедровой настойки" предложено проводить по содержанию суммы фенольных соединений, в экспериментальных исследованиях препарат дозировался в мг (по содержанию суммы фенольных соединений) на килограмм массы тела животного.

Изучение гепатопротекторной активности настойки семян сосны кедровой сибирской В семенах сосны кедровой сибирской содержится целый комплекс биологически активных веществ, обладающих практически всеми механизмами действия, свойственных известным гепатопротекторам. Так, в семенах сосны кедровой сибирской широко представлена группа полифенолов (флавоноиды, лигнаны и др.), а известно, что полифенольные соединения обладают такими сторонами действия, как антиоксидантная и антигипоксическая, которые рассматриваются как базисные для формирования различных фармакологических активностей, требующих энергетической обеспеченности и целостности мембран клеток и их органелл (А.Е. Александрова, 1988; Л.В. Пастушенков, Е.Е. Лесиовская, 1994; Ю.В. Медведев,. А.Д. Толстой, 2000 и др.). Именно эти активности лежат в основе многих видов действия, в том числе противовоспалительного, репаративного, иммуномодулирующего, обеспечивающих различные протективные эффекты (гепатопротекторный, кардиопротекторный, гастропротекторный и др.).

Можно полагать, что антиоксидантный эффект полифенольных соединений семян сосны кедровой сибирской дополняется и поддерживается входящими в их состав αтокоферолом, убихиноном и каротиноидами. Определенный вклад в нормализацию функционирования дыхательной функции митохондрий и улучшение доставки кислорода в ткани (в антигипоксический эффект) могут внести содержащиеся в семенах сосны кедровой сибирской ионы цинка и меди. Торможение процесса деструкции и поддержание репаративно-регенераторных процессов в печени поддерживается фосфолипидами. содержащимися в семенах.

Методы исследования

Использовалась модель хронического поражения печени (Венгеровский А.И., Головина Е.Л., Коваленко М.Ю. и др. Совместное применение преднизолона и гепатопротекторов, содержащих фосфолипиды, при экспериментальном хроническом гепатите // Эксперим. и клинич. фармакология. - 1999. - Т.62, №2. - С.28-30). Продолжительность эксперимента составила 30 дней. Животным 3 раза в неделю вводили перорально 2 мл/кг ССІ<sub>4</sub> в 50% масляном растворе. Начиная с 15 дня после начала интоксикации, крысы 3-й, 4-й и 5-й групп, наряду с ССІ<sub>4</sub>, также рег оз получали ежедневно исследуемое вещество в дозах 0,35 мг/кг, 0,7 мг/кг и 1,4 мг/кг соответственно; препарат сравнения силибор в дозе 100 мг/кг вводили животным 6-й группы. На 30-й день всех животных выводили из опыта декапитацией с помощью гильотины в соответствии с Методическими рекомендациями по эвтаназии экспериментальных животных.

О тяжести поражения печени судили по значениям коэффициента массы печени, который рассчитывали как отношение массы печени в мг к массе животного в г, гистологической оценке срезов органа и по активности в плазме крови маркерных ферментов состояния печени аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ).

В гистологических исследованиях кусочки печени фиксировали в течение 24 часов в растворе 10% формалина. При исследовании гистологических препаратов, прошедших стандартную методику проводки через спирты, залитые в парафин и окрашенные гематоксилин-эозином, использовался светооптический микроскоп БИОЛАМ. Подсчет и оценка изменений проводились при увеличении × 100 в 10 полях зрения.

Активности АЛТ и АСТ определяли оптимизированным УФ-анализом в соответствии с рекомендациями JFCC (Bergmeyer H.U., et al. // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. - 1986. - V. 24. - P.497). Использованы реактивы фирмы Diasys. Забор крови производили из подъязычной вены.

Результаты и их обсуждение

35

40

Введение крысам тетрахлорметана 3 раза в неделю в течение 4-х недель привело к выраженному поражению печени, о чем свидетельствовали как коэффициенты массы печени, так и результаты гистологического и биохимического исследований.

Степень повышения коэффициента массы печени животных при токсическом ее поражении является объективным показателем выраженности воспалительного процесса в органе (Александрова А.Е., Виноградова Т.И., Литвинов А.В. и др. Методы профилактики и устранения гепатотоксичности // Впервые в медицине, Санкт-Петербург. 1 995. - №2, 3. - С.8). Из Таблицы 3 видно, что у нелеченых животных, получавших ССІ<sub>4</sub>, коэффициент массы печени по сравнению с интактными вырос на 52,4% (с 38,9 до 59,3). У животных, которым вводили настойку семян сосны кедровой сибирской в самой низкой дозе (0,35 мг/кг), снижение этого показателя проявилось только в виде тенденции. В дозах 0,7 мг/кг и 1,4 мг/кг исследуемое вещество так же, как и препарат сравнения силибор, статистически значимо снижали коэффициент массы печени при отсутствии видимых различий между показателями этих групп.

Таблица	. 3					
	Изменения коэффициентов массы печени					
№ п/п	Условия опыта	Количество животных в группе	Коэффициент массы печени			
1	Интактные	6	38,9±2,1			
2	CCl <sub>4</sub>	8	59,3±2,3 p <sub>2-1</sub> <0,05			
3	CCl <sub>4</sub> + CKH 0,35 мг/кг	6	5,1±2,7			
4	CCl <sub>4</sub> + CKH 0,7 мг/кг	8	48,7±1,3 p <sub>5-2</sub> <0,05			
5	CCl <sub>4</sub> + CKH 1,4 мг/кг	7	44,7±1,8 p <sub>5-2</sub> <0,05			
6	CCl <sub>4</sub> + Силибор 100 мг/кг	9	43,4±1,5 p <sub>6-2</sub> <0,05			

Проведенные гистологические исследования показали, что созданная экспериментальная модель соответствовала гистологическим критериям, характеризующим развитие хронического токсического активного стеатогеиатита. Оценивались следующие признаки:

- жировой некроз гепатоцитов в дольках, который по распространенности характеризовался как перипортальный, центролобулярный, диффузный в процентном отношении, исходя из числа гепатоцитов в дольке (около 300). Соответственно проценту некротизированных гепатоцитов оценивалась активность хронического токсического стеатогепатита: слабо выраженная активность - до 10%, умеренная активность - 11-29%, выраженная активность - 30% и более;

- дистрофия как начальный этап повреждения. В данной экспериментальной модели жировая внутриклеточная, характеризовавшаяся по локализации (перипортально, центролобулярно) и величине жировых вакуолей (мелко-, крупнокапельная);
- фиброз. Полуколичественным методом оценивался склероз в портальных трактах по степени выраженности и ширине прослоек соединительной ткани в портальных трактах (слабый, умеренный, выраженный);
- воспаление, которое характеризовалось лимфогистиоцитарной и нейтрофильной лейкоцитарной инфильтрацией портальных трактов и долек по степени выраженности (слабая до 50 клеток, умеренная от 51 до 100, выраженная более 100).

При исследовании препаратов печени интактных крыс в дольках обнаружено радиальное расположение балок в виде тяжей от центральной вены к портальным трактам, гепатоциты местами разной оптической плотности в связи со степенью накопления гликогена в цитоплазме. Отсутствовали дистрофические и некротические изменения, наблюдалась незначительная, в пределах нормы лимфоидная инфильтрация перенхимы. Портальные тракты содержали триады: артерию, вену и желчный проток, которые были окружены незначительным количеством соединительнотканной стромы. Синусоидальные капилляры в дольках не расширены, имелось полнокровие центральных вен (Фиг.3A).

Гистологическая картина препаратов печени крыс, получавших CCl<sub>4</sub> (группа 2), имела признаки хронического активного токсического стеатогепатита с выраженной активностью, напоминала токсическую дистрофию печени и заключалась в следующем: поражение печени носило тотальный характер, печеночные дольки с резко выраженной дискомплексацией балочного строения на фоне преобладания крупнокапельной жировой дистрофии гепатоцитов, которая локализовалась во всех отделах долек. В некоторых дольках дистрофические изменения преобладали перипортально. Имелся жировой некроз (фанероз) более 30% гепатоцитов долек в различных участках (преимущественно околопортально). В этих зонах - лимфоцитарный инфильтрат. Воспаление носило характер выраженного и захватывало портальные тракты и дольки, кроме этого, воспалительный инфильтрат состоял из гистиоцитов и нейтрофильных лейкоцитов. небольшое количество последних проникало в дольки, в синусоидах встречались купферовские клетки. Фиброз портальных трактов выражен повсеместно, прослойки соединительной ткани узкие, в единичных полях зрения - широкие, окружали дольки с тенденцией к аннулярному склерозированию и формированию мелкоузлового цирроза печени. В некоторых дольках отсутствовала центральная вена ("ложные дольки"), что является диагностическим критерием формирования цирроза печени (Фиг.3Б).

В печени крыс, получавших СКН в самой низкой дозе (0,35 мг/кг), гистологические признаки хронического активного токсического стеатогепатита также были с выраженной активностью. Поражение печени тотальное: значительное нарушение балочного строения, жировая дистрофия гепатоцитов в виде преобладания крупных жировых вакуолей, которая локализовалась и перипортально, и центролобулярно, в некоторых дольках основная локализация изменений - центролобулярно. Мелкокапельная жировая дистрофия носила рассеянный характер. Наблюдалась тенденция снижения жирового некроза гепатоцитов: в некоторых дольках с вовлечением от 20 до 30% паренхимы, в 2/3 долек некроз носил выраженный характер и был более 30%. Склероз портальных трактов был незначительно слабее, чем у животных 2-й группы; наблюдались узкие прослойки соединительной ткани вокруг долек с охватом их по периметру. В незначительном количестве участков склероз портальных трактов умеренно выражен. Снижалось количество клеток воспалительного инфильтрата в

трактах - от выраженного до умеренного выраженного.

10

40

У животных, получавших СКН в дозе 0,7 мг/кг, изменения соответствовали хроническому токсическому стеатогепатиту с умеренной активностью и характеризовались: некроз 10-20% гепатоцитов с локализацией перипортально, дистрофия по-прежнему преобладала в виде крупнокапельного ожирения гепатоцитов рассеянного характера. Склероз портальных трактов носил умеренный характер в виде узких прослоек зрелой соединительной ткани. Воспалительный инфильтрат мононуклеарами (лимфоциты, гистиоциты) выраженный и умеренно выраженный, а нейтрофильными лейкоцитами - слабовыраженный.

В препаратах печени крыс, леченных СКН в дозе 1,4 мг/кг (5-я группа) (Фиг.3В), и силибором (6-я группа), выявленные гистологические признаки были одинаковыми с незначительными различиями. В этих группах развитие хронического токсического стеатогепатита характеризовалось минимальной активностью, что подтверждалось перипортальными некрозами до 10% гепатоцитов либо отсутствием в некоторых дольках некроза вообще, преимущественно перипортальной мелкокапельной жировой дистрофией в печени крыс 5-й группы, а у животных, получавших силибор, - локализацией последней центролобулярно, слабовыраженной инфильтрацией портальных трактов и долек лимфоцитами и гистиоцитами. Фиброз портальных трактов в обеих группах был слабовыраженным. Следует отметить, что проявления белковой, в т.ч. баллонной, дистрофии в данной экспериментальной модели (все группы крыс) не были обнаружены.

На основании проведенной сравнительной гистологической оценки печени крыс разных групп можно сделать следующее заключение: во всех группах отмечено развитие хронического токсического стеатогепатита с разной степенью активности, которая проявилась количеством гепатоцитов, подвергшихся некрозу, уровнем воспалительных и дистрофических изменений: в группе нелеченых крыс, получавших ССІ<sub>4</sub>, - некроз более 30% гепатоцитов, фиброз и воспалительный инфильтрат - выраженный. В группах, получавших препараты: СКН в дозе 0,35 мг/кг - некроз более 30%, фиброз и воспаление несколько менее выраженные; СКН в дозе 0,7 мг/кг - некроз 10-20%, фиброз и воспаление умеренно выраженные; СКН в дозе 1,4 мг/кг и силибор - менее 10% некротизированных гепатоцитов, слабовыраженный фиброз и воспаление в портальных трактах.

Таким образом, отмечено увеличение гепатозащитного действия препарата с возрастанием его дозы. Сравнительный анализ показал, что СКН в дозе 1,4 мг/кг и силибор наиболее благоприятно влияли на морфологическое состояние печени крыс и обладали выраженным гепатопротекторным действием: некроз и фиброз в этих группах был одинаковым и минимальным. При выявлении мелкокапельной жировой дистрофии в клетках печени установлена преимущественная ее локализация у крыс, получавших СКН в дозе 1,4 мг/кг - перипортально, а в группе животных, леченных силибором, - центролобулярное поражение гепатоцитов (Фиг.3В), т.е. в зоне действия P-450.

Важным показателем, отражающим степень повреждения печени, является активность ферментов печеночного происхождения в крови (индикаторные ферменты цитолитического синдрома). Известно, что изменение их активности может наступить значительно раньше, чем возникают гистологически регистрируемые деструктивные процессы в клетках паренхимы органа (Блюгер А.Ф. Диагноз и дифференцированный диагноз хронического гепатита и цирроза печени / А.Ф. Блюгер, И.Н. Новицкий // Клин, мед. - 1985. - Т.63, №2. - С.134-140).

Нами определялась активность в сыворотке крови аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы. Полученные результаты, представленные в Таблице 4,

свидетельствуют о выраженном цитолизе печеночных клеток и выходе индикаторных ферментов в кровь у нелеченых животных, получавших гепатотоксин (CCl<sub>4</sub>). Активность АЛТ у них повысилась на 150%, а АСТ - на 71,1%. Наиболее выраженный гепатопротекторный эффект, сопоставимый с действием силибора, СКН проявила в дозе 1,4 мг/кг, снизив значения активностей АЛТ и АСТ на 34,3% и 65,1% соответственно. Достоверно, хоть и менее выражено снизились значения активностей аминострансфераз и под влиянием СКН в дозе 0,7 мг/кг. В дозе 0,35 мг/кг понижение активности АЛТ было зарегистрировано лишь в виде тенденции.

Таким образом, изучение гепатопротекторной активности "Сосны кедровой настойки" на модели хронического токсического поражения печени тетрахлорметаном показало, что исследуемое вещество обладает выраженной, сопоставимой с действием известного гепатопротектора силибора, гепатозащитной активностью, о чем свидетельствуют существенное снижение коэффициента массы печени, результаты гистологических и биохимических исследований. Морфометрическая оценка состояния печени выявила некоторые преимущества СКН перед препаратом сравнения. Если у животных, леченных силибором, мелкокапельная жировая дистрофия сохранялась в наиболее важной для функциональной активности органа центролобулярной зоне (зоне действия цитохрома P-450), то при действии исследуемого вещества мелкокапельная жировая дистрофия наблюдалась только перипортально.

	Изменени	я активности аминотрансфераз в сыворотк	е крови крыс
№ п/п	Усповия опыта	Активность АЛТ, ед./л	Активность АСТ, ед./л
1	Интактные животные n=6	79,2±6,6	164,0±9,2
2	CCl <sub>4</sub> n=6	198,1±16,2	474,5±48,5*
3	CCl <sub>4</sub> + CKH 0,3 5 мг/кг n=5	171,3±14,3** (-13,5%)	278,8±35,7** (-41,2%)
4	CCl <sub>4</sub> + CKH 0,7 мг/кг n=6	145,2±13,4** (-26,8%)	199,1±41,1** (-58%)
5	CCl <sub>4</sub> + CKH 1,4 мг/кг n=6	130,1±18,3** (-34,3%)	165,5±17,3** (-65,1%)
6	CCl <sub>4</sub> + силибор, 100 мг/кг n=6	129,8±17,6** (-34,5%)	169,2±26,3** (-64,3%)
* - 1	достоверно по сравнению с 1-й группо	рй	
** -	достоверно по сравнению с 2-й групп	пой	

Изучение антиоксидантной активности настойки семян сосны кедровой сибирской Для понимания механизмов гепатопротекторного действия СКН важное значение имеет изучение антиоксидантного статуса организма. Исследование антиоксидантного действия "Сосны кедровой настойки" было проведено на модели экспериментального токсического гепатита, индуцированного четыреххлористым углеродом. В качестве препарата сравнения был использован широко применяемый в медицинской практике гепатопротекторный препарат силибор.

Выбор указанной модели был продиктован тем обстоятельством, что повреждающим фактором действия четыреххлористого углерода являются свободно-радикальные продукты, образующиеся при его метаболизме на цитохроме P-450 печени: -CCl<sub>3</sub>·, CHCl<sub>2</sub>· и другие радикалы (Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г., 1985; Бобырев В.Н., 1987; Бобырев В.Н. и др., 1994; Дадали В.А., 1999, Connor, 1990).

Методы исследования

20

40

45

Определение концентрации продуктов перекисного окисления липидов по тесту с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) проводили по методу (Tian L. Alteration of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromol-ecules in different organs of rats during aging // Free

Radical. Biol. Med., 1998. - Vol.24, №9. - P.1477-1484). Принцип метода основан на реакции взаимодействия малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного продукта. В случае определения продуктов ПОЛ в ткани печени 100 мг ткани гомогенизировали с 3 мл физиологического раствора. Измерения проводили при длинах волн 535 и 580 нм. Концентрацию малонового диальдегида рассчитывали по формуле

 $C = \Delta E_{535-580} \cdot 1,88 \cdot 10^5 \cdot I$ , где

С - концентрация малонового диальдегида (мкмоль/л);

 $\Delta E_{535-580}$  - разница оптических плотностей образца при 535 и 580 нм;

 $1,88\cdot10^5\,\mathrm{M}^{-1}\,\mathrm{cm}^{-1}$  - коэффициент молярной экстинкции.

Определение антиоксидантной активности плазмы крови проводили по методу (Valkonen H., Kuusi T. Spectrophotometric assay for total peroxylradical trap-ping antioxidant potential in human serum // J. Lipid Res., 1997. - Vol.38. - P.823-833). Принцип метода: под воздействием гидроксильных радикалов происходит сольволиз дибутирата флуоресцеина, с формированием оптически активного флюоресцеина, обладающего как поглощением (490 нм), так и флуоресценцией (530 нм). Антиоксидантную активность плазмы крови рассчитывали по формуле

А=Р⋅0,077⋅Е, где

10

20

30

40

Р - конечное разведение плазмы;

 $0,077~{
m M}^{-1}~{
m cm}^{-1}$  - коэффициент молярной экстинкции флуоресцеина;

Е - оптическая плотность при длине волны 490 нм.

Определение восстановленного глутатиона в гомогенате печени проводили по методу (Ellman G.L., 1959). Принцип метода основан на способности низкомолекулярных тиоловых соединений при взаимодействии с реактивом Эллмана образовывать окрашенное соединение тио-2-нитро-бензойную кислоту, водный раствор которого имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм. Навеску ткани печени 100 мг гомогенизируют с 3 мл физиологического раствора. Концентрацию SH-групп рассчитывают по формуле

 $C = \Delta E \cdot 13 \cdot 10^3 \cdot P$ , где

ΔЕ - изменение оптической плотности раствора;

 $13.10^3$  - коэффициент молярной экстинкции;

Р - конечное разведение гомогената.

Определение каталазной активности проводили по методу (Leff J.A., Oppengard M.A., Curiel T.J. et al. Progressive increases in serum catalase activity in advancing human immunodeficiency virus infection // Free Radic. Biol. Medicine. - 1992. - Vol.13, №2. - P.143-149). Скорость снижения концентрации перекиси водорода в инкубационной среде регистрируется спектрофотометрически при длине волны 230 нм в течение 3 минут.

Определение активности супероксиддисмутазы с использованием реакции аутоокисления кверцетина проводили по методу (Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. // Вопросы мед. химии. - 1990. - Т.36. - вып.2. - С.88-91). Метод основан на определении степени торможения реакции окисления кверцетина. В результате окисления кверцетина при рН 10,0 в присутствии тетраметилэтилендиамина в аэробных условиях происходит генерация супероксидного анион-радикала, который, в свою очередь, в присутствии СОД подвергается дисмутации. Инкубационная смесь содержала 1,4 мкМ кверцетина,

0,015 М фосфатного буфера (рН 7,8), 0,08 мМ ЭДТА, 0,8 мМ тетраметилэтилендиамина, 0,1 мл биологического материала в конечном объеме 3,5 мл. Скорость окисления кверцетина оценивали по изменению оптической плотности при 406 нм в течение 20 минут.

Определение активности глутатионпероксидазы с использованием гидроперекиси третбутила по методу (Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Определение активности глутатионпероксидазы эритроцитов при насыщающих концентрациях субстрата. // Лабораторное дело. - 1986, №12. - С.721-724). Принцип метода: Глутатионпероксидаза, используя в качестве кофермента восстановленный глутатион, катализирует
 восстановление гидроперекиси третбутила. Об активности глутатионпероксидазы судили по скорости убыли концентрации восстановленного глутатиона.

Определение активности глутатионредуктазы проводили по методу (Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical metods. 2-d. Edition. - N.Y., S. Francisco, London: Grune and Stratton. - 1975. - P.69-71). По мере восстановления окисленного глутатиона расходуется эквимолярное количество НАДФН, скорость уменьшения содержания которого определяют по снижению оптической плотности при длине волны 340 нм за 10 минут. Неспецифическую НАДФН-оксидазную активность учитывают с помощью холостой пробы, не содержащей глутатион.

Результаты исследования

45

При развитии индуцированного тетрахлорметаном токсического гепатита наблюдалось усиление процессов перекисного окисления липидов, что нашло отражение в увеличении на 30% содержания малонового диальдегида и снижении на 22% содержания глутатиона в печени (Таблица 5).

Параллельно наблюдалось достоверное (на 9,4%) повышение концентрации МДА в сыворотке крови, тогда как общая антиоксидантная активность сыворотки крови (TRAP) существенно не изменялась, что, по-видимому, связано с резким увеличением активности индуцибельных антирадикальных ферментов (Таблица 6): глутатионпероксидазы (на 544%), каталазы (на 178%), глутатионредуктазы (на 71%). В условиях данного эксперимента не наблюдалось достоверного изменения активности супероксиддисмутазы, отмечена лишь тенденция к ее снижению.

]	Измене	ение показателей, отраж		перекисного окислени и сыворотки крови (М		тиоксидантной активности пе
	№ п/п	Группы животных, доза	МДАв печени (нмоль/ г)	Глутатион в печени (нмоль/г)	МДАв сыворотке крови (нмоль/мл)	Общая антирадикальная актив ность плазмы крови (нмоль/мл)
	1.	Интактная группа	451,6±6,5 n=6	1369±25,3 n=6	12,7±0,5 n=6	13,2±0,3 n=6
	2.	Группа CCl <sub>4</sub>	587,6±13,9 n=6*	1068±31,7 n=7*	13,9±0,3 n=8*	13,9±0,2 n=8
	3.	Группа СКН 0,35 мг/кг	530,3±10,9 n=5**	1495±27,7 n=5**	13,8±0,3 n=6	14,8±0,6 n=6
	4.	Группа СКН 0,7 мг/кг	491,1±9,9 n=7**	1499±30,5 n=8**	10,6±0,3 n=8**	13,2±0,2 n=7**
	5.	Группа СКН 1,4 мг/кг	524,4±9,0 n=7**	1394±22,7 n=6**	9,3±0,4 n=7**	13,8±0,2 n=5
	6.	Группа Силибор 100 мг/кг	479,1±10,9 n=9**	1620±36,0 n=9**	10,1±0,4 n=8**	13,5±0,2 n=9

Табл	пица 6						
Изме	Изменение активности антиоксидантных ферментов при развитии токсического поражения печени, вызванного тетрахлорметаном						
№ п	/п Группы животных, доза	Активность катала- зы (мккат/гНb)	.	вность глутатион- эксидазы (мккат/ гНb)	AKT	тивность глутатионре- цуктазы (мккат/гНb)	Активность супероксид- дисмутазы (у.е./гНb)
1.	Интактная группа	49,9±2,8 n=6		3,8±0,7 n=6		277,5±60,5 n=6	29,0±2,2 n=4

2.	Группа ССІ <sub>4</sub>	139,5±7,9 n=6*	24,5±2,2 n=7*	475,6±32,7 n=7*	23,5±2,7 n=8	
3.	Группа СКН 0.35 мг/кг	76,6±5,9 n=6**	15,4±1,1 n=6**	490,9±41,6 n=6	25,1±1,4 n=5	
4.	Группа СКН 0,7 мг/кг	62,4±3,7 n=8**	13,6±0,9 n=7**	347,0±14,9 n=8**	33,0±3,1 n=7**	
5.	Группа СКН 1,4 мг/кг	62,0±4,3 n=7**	13,2±1,2 n=7**	339,8±54,7 n=7	32,7±1,4	
6.	Группа Силибор 100 мг/кг	96,0±19,2 n=8**	7,0±0,9	341,2±17,5 n=9	27,8±3,3 n=9	
* - дос	* - достоверно по сравнению с первой группой;					
** - до	** - достоверно по сравнению со второй группой.					

5

40

Повышение активности индуцибельных ферментов, в частности глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы, связано с усилением процесса окисления восстановленного глутатиона в глутатиондисульфид под действием свободных радикалов, образованных в результате метаболизма тетрахлорметилена (Connor H.D. et al. Reaction of glutathione with a free radical metabolite of CCl4 // Mol. Pharmacol. - 1990. - №37. - P.443-451). Повышение активности каталазы зависит от усиленной продукции перекиси водорода.

Таким образом, под действием  $CCl_4$  происходят глубокие нарушения ферментного и неферментного звеньев антиоксидантной системы печени.

Использование в качестве гепатопротектора "Сосны кедровой настойки" в дозах 0,35 мг/кг, 0,7 мг/кг и 1,4 мг/кг и силибора в дозе 100 мг/кг приводило к нормализующим изменениям процессов перекисного окисления липидов в печени. Во всех группах экспериментальных животных отмечалось достоверное снижение уровня МДА соответственно на 9,8; 16,5; 10,8 и 18,5% и достоверное увеличение уровня глутатиона соответственно на 40; 40,3; 30,5 и 51,7%. При этом наиболее эффективным следует признать действие настойки в дозе 0,7 мг/кг.

В сыворотке крови препараты также существенно снижали интенсивность перекисного окисления липидов. При использовании СКН установлен дозозависимый эффект. При возрастании доз СКН (0,35 мг/кг, 0,7 мг/кг и 1,4 мг/кг) содержание МДА в сыворотке крови снижалось на 0,7%, 23,8% и 32,8% соответственно. Характер влияния изученных препаратов на антиоксидантные ферменты имели свои особенности. При введении СКН в дозах 0,7 мг/кг и 1,4 мг/кг активность индуцибельных ферментов существенно снижалась: каталаза на 55,3% и 56%; глутатионпероксидаза на 44,5% и 54%; глутатионредуктаза на 27% и 28,6% соответственно, что для каталазы и глутатионредуктазы укладывалось в диапазон показателей интактных животных. При этом наблюдалось достоверное в сравнении с контрольной группой увеличение активности супероксиддисмутазы на 40,4 и 39% соответственно. Введение силибора в дозе 100 мг/кг сопровождалось значительным снижением активности индуцированной каталазы и в тоже время не приводило к увеличению активности супероксиддисмутазы. Изменения активностей глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы были сходными с аналогичными в группах животных, получавших СКН в дозах 0,7 мг/кг и 1,4 мг/кг; активность глутатионредуктазы достоверно снижалась на 28,3%; глутатионпероксидазы - на 54%.

Таким образом, сравнимая выраженность действия "Сосны кедровой настойки" (в дозах 0,7 мг/кг и 1,4 мг/кг) и эталонного препарата силибора (в оптимальной дозе) наблюдалась в отношении системы глутатиона и связанных с ним ферментов глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, а также в отношении влияния на перекисное окисление липидов в гепатоцитах и общей антиоксидантной активности крови. Изменения же активностей антирадикальных и антиперекисных ферментов имели отличия: введение СКН сопровождалось более выраженным реагированием супероксиддисмутазы, а силибора - каталазы.

Можно полагать, что гепатозащитное действие разработанного нами нового

препарата "Сосны кедровой настойка" обусловлено как собственной антиоксидантной активностью, так и индукцией эндогенных антиоксидантных систем.

Антигипоксическая активность настойки семян сосны кедровой сибирской Антигипоксическая активность фармакологических веществ оценивается на моделях разных форм гипоксии: гипоксической, циркуляторной, гемической и гистотоксической. Чаще других используют разновидности гипоксической гипоксии. Нами оценка антигипоксической активности исследуемого вещества проведена на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией. Мыши-самцы (16-20 г) помещались в герметически закрывающуюся камеру (эксикатор). Для обеспечения полной герметизации дополнительно снаружи между крышкой эксикатора и его корпусом прокладывали специальный герметизатор. В камеру одновременно помещали по 3 животных из контрольной и двух опытных групп. СКН вводили перорально ежедневно в течение пяти дней мышам одной группы в дозе 0,7 мг/кг нативной настойки; другой - 1,4 мг/кг деалкоголизированной. Последнее введение осуществляли за 2 часа до помещения животных в камеру. Мышам контрольной группы в то же время и в том же объеме вводилась вода. Полученные результаты представлены в Таблице 7.

Таблица 7			
	Влияние "Сосны кедровой настой	ки" на длительность жизни мышей в за	мкнутом пространстве
№ п/п	Условия опыта	Длительность жизни, мин	Увеличение длительности жизни, %
1	Контрольные мыши n=6	32,4±0,3	-
2	СКН 0,7 мг/кг n=6	43,9±0,4*	35,5
3	СКН (д/а) 1,4 мг/кг n=6	45,1±0,4*	39,2

20

Как видно из таблицы, исследуемое вещество проявило выраженное антигипоксическое действие в средней "терапевтической" дозе 0,7 мг/кг, и в большей из испытанных доз (1,4 мг/кг в деалкоголизированном виде), практически одинаково, статистически значимо, повысив длительность жизни животных в герметически замкнутом пространстве (на 35,5% и 39,2% соответственно). Отсутствие дозозависимости в этом эксперименте, очевидно, связано с тем, что в меньшей из использованных доз (0,7 мг/кг) наблюдался синергизм действия биологически активных веществ настойки и этилового спирта, входящего в ее состав. Известно, что при действии алкоголя в низких дозах возникает неглубокое торможение центральной нервной системы, создаются условия для экономного расходования энергии и повышается устойчивость организма к гипоксии (Потонди А., Чалан Л. Действие алкоголя на экспериментальную церебральную гипоксию // Венг. фармакотерап. - 1972. - №1-2. - С.78-81; Kyol Kikuo Effect of hypoxta on the ratio transport in rat brain slices and the protective action of anaestetic drugs with special reference of ethylcarbamate // J. Na-ra Med. Assoc. - 1974. - Vol.25, №1-2. - P.83-93).

Таким образом, на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией установлено наличие у "Сосны кедровой настойки" антигипоксической активности.

Изучение гиполипидемического действия настойки семян сосны кедровой сибирской Известно, что печень играет ключевую роль в обмене липидов и липопротеинов. Нарушение метаболизма в печени способствует развитию дислипидемий и атеросклероза (Климов А.Н., Никульчева Н.Г. Липиды, липопротеиды и атеросклероз. - Санкт-Петербург: Питер, 1995. - 298 с.; Brown M.S., Goldstein I.L. A receptor-mediated pathway
 for cholesterol homeostasis // Science. - 1986. - Vol.232. - P.34-47). В печени происходит синтез холестерина (ХС), апобелков, липопротеидов очень низкой плотности, насцентных, потенциально антиатерогенных липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), а также фермента деградации холестерина 7-α-холестерингидроксилазы. Кроме того,

в ней сосредоточено более 70% апоВ, Е-рецепторов, способствующих захвату из крови атерогенных липопротеидов с последующей деградацией XC и образованием желчных кислот (Brown M.S., Goldstein L.J., 1986). Нарушение активности этих гомеостатических механизмов печени приводит к развитию дислипидемии атерогенного характера ретепционного типа (Gainer J.I. Hypoxia and atherosclerosis: reevaluation of the old hypothesis // Atherosclerosis. - 1987. - Vol.68, №3. - P.263-266).

Даже в обычных условиях для артериальной стенки характерным является значительное ограничение кровоснабжения, а под влиянием разных факторов риска развития атеросклероза обнаруживается выраженное превалирование анаэробного пути энергопродукции над аэробным и активация процессов перекисного окисления липидов, что способствует развитию отека, увеличению проницаемости для компонентов крови, в т.ч. для атерогенных липопротеидов и глубокому их окислению (Чернов Ю.Н., Васин М.В., Баатищева Г.А. Патологические изменения клеточных мембран при ишемической болезни сердца и возможные пути фармакологической коррекции // Эксперим. и клин. фармакол. - 1992. - №4. - С.67-72; Bedwell S.R., Dean T., Jessup W. The action of defined oxygencentered free radicals on human low density lipoprotein // Biochem. J. -1989. - Vol.262. - P.707-712; Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: perspective for the 1990 s. Re-view article // Nature. - 1993. - Vol.362. - P.801-809). При этом наблюдается определенный параллелизм между степенью гипоксии артериальной стенки (снижение активности дыхательных ферментов), с одной стороны, и угнетением синтеза простациклина и атеросклеротического ее поражения - с другой (Schneiderman G., Goldstick T. Carbon monoxide induced arterial wall hypoxia and atherosclerosis // Atherosclerosis. - 1978. - Vol.30, №1. - P.1-13).

В литературе имеются данные о положительном действии средств, обладающих антигипоксическими и антиоксидантными свойствами (ГОМК, олифен, амтизол, убинон. α-токоферол и др.), при гиперлипидемии и атеросклерозе как в условиях эксперимента, так и клиники (Дудаев В.А., Бородкин В.В., Аббуд А. и др. Применение антиоксиданта убинона в комплексном лечении больных ишемической болезнью сердца // Кардиология. - 1989. - №1. - С.48-52; Ремезова О.В. Современные данные о патогенезе атеросклероза. Сообщение 2. Метаболические и другие нарушения артериальной стенки и печени, способствующие развитию атеросклероза // Эфферентная терапия. - 1998. №4. - С.15-20; Choares M.Y., Perdriset G.M., Lemeberdiere F.A. et al. Alfa-tocoferol: effect on plasma lipoprotein in hypercholesterolemic patients // Israil. J. Med. Sc. - 1987. - Vol.23. - №3. - Р.869-872).

35 Наличие у "Сосны кедровой настойки" гепатопротекторного действия, а также антигипоксической и антиоксидантной активностей послужило обоснованием для исследования ее гиполипидемических свойств. Использовались крысы с хроническим токсическим тетрахлорметановым поражением печени, что и при исследовании гепатопротекторной и антиоксидантной активностей.

Методы исследования

40

Изучение гиполипидемических свойств СКН проводили в соответствии с Методическими указаниями МЗ РФ, 2000 (Рыженков В.Е., Ремезова О.В., Макаров В.Г. Методические указания по изучению гиполипидемического и антиатеросклеротического действия фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. - М., - 2000. - С.224-227). Определение уровня холестерина (ХС) в сыворотке крови осуществляли колориметрическим ферментативным методом - САОД-РАР (Schlettler G., Nussler E. // Arbeitsmed Socialmed. Preventivmed, 1975. - №10. - S.25) с применением набора реагентов

фирмы "Vital Diagnostics" (Германия). Расчет концентрации XC производили по формуле

5

20

Д - оптическая плотность (Richmond W., Nussler E. // Clin. Chem. - 1973. - Vol.19. - P.1350.).

Содержание  $\alpha$ -XC находили с помощью реактивов той же фирмы при длине волны 546 нм на спектрофотометре СФ-26 после предварительного осаждения  $\beta$ -ЛП гепарином в присутствии ионов Mn<sup>++</sup> (Burstein M. et al., 1970). В основе определения триглицеридов (ТГ) при использовании реактивов фирмы "Vital Diagnostics" лежит каскад реакций расщепления ТГ, в завершении которых образуется окрашенное соединение хинонимин с максимумом поглощения 500 нм, концентрация которого, определяемая фотометрически, пропорциональна концентрации ТГ в крови. Определение гидроперекисей (ГП) в апоВ-содержащих ЛП, осажденных гепарином в присутствии ионов Mn<sup>++</sup>, осуществляли по методу El-Saadani M. et al. (El-Saadani M. et al. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent // J. Lipid Res. - 1989. - Vol.30, №4. - P.627-630).

Результаты проведенных исследований представлены в Таблице 8.

	№ п/п	Условия опыта	Общий XC, ммоль/л	ТΓ, ммоль/л	α-ХС, нмоль/л	Гидроперекиси в апо I ЛП, нмоль/л
	1	Интактные n=6	2,77±0,05	0,65±0,04	1,04±0,03	7,93±0,34
5	2	CCl <sub>4</sub> n=8	3,12±0,07*	1,03±0,03*	0,71±0,02*	10,65±0,71*
	3	CCl <sub>4</sub> + CKH 0,35 мг/кг n=6	2,74±0,05**	0,62±0,08**	0,85±0,03	10,03±0,34
	4	CCl <sub>4</sub> + CKH 0,7 мг/кг n=8	2,67±0,07**	0,81±0,03**	0,93±0,05**	9,28±0,33
)	5	CCl <sub>4</sub> + CKH 1,4 мг/кг n=7	2,49±0,04**	0,78±0,04**	0,9±0,02**	8,47±0,34*
	6	CCl <sub>4</sub> + силибор 100 мг/кг n=9	2,74±0,06**	0,66±0,05**	0,89±0,05**	7,65±0,34*

Как и следовало ожидать, развитие хронического токсического стеатогепатита у крыс сопровождалось достоверным повышением в сыворотке крови содержания холестерина (с  $2,77\pm0,05$  до  $3,12\pm0,07$  ммоль/л), триглицеридов (с  $0,65\pm0,04$  до  $1,03\pm0,03$  ммоль/л) и также достоверным понижением уровня антиатерогенной фракции липопротеидов -  $\alpha$ -XC (с  $1,04\pm0,03$ ) до  $0,71\pm0,02$  ммоль/л). Исследуемое вещество во всех используемых дозах предотвращало гиперлипидемические сдвиги, наблюдаемые при хроническом гепатите. Уровень XЛ и ТГ под влиянием "Сосны кедровой настойки" снижался до значений интактных крыс. Статистически значимо восстанавливалось и содержание в крови антиатерогенных липопротеидов.

Как уже упоминалось, перекисное окисление липидов атерогенных липопротеидов низкой плотности значительно увеличивает их повреждающее действие на артериальную стенку и признается одним из главных факторов атерогенеза. В связи с этим нами было изучено влияние СКН на перекисное окисление атерогенных апоВ-содержащих липопротеидов в сыворотке крови крыс.

Как видно из Таблицы 8, в условиях экспериментального гепатита и развившейся

гиперлипидемии достоверно увеличилось содержание продуктов ПОЛ в апоВ-содержащих липопротедах. "Сосны кедровой настойка" в дозе 1,4 мг/кг достоверно снижала содержание гидроперекисей в апоВ-содержащих липопротеидах. Таким образом, на модели хронического токсического поражения печени крыс,

сопровождающегося развитием дислипидемии атерогенного характера, установлена значительная гиполипидемическая активность СКН, нормализация уровня в крови антиатерогенных липопротеидов и снижение содержания гидроперекисей в апоВсодержащих ЛП, одного из главных факторов атерогенеза.

Основные выводы

10

- 1. На модели хронического токсического гепатита, вызванного длительным введением тетрахлорметана при использовании биометрических, биохимических и гистологических методов, у "Сосны кедровой настойки" выявлено отчетливо выраженное, сопоставимое с эффектом референтного препарата силибора, гепатопротекторное действие. По некоторым показателям морфометрической оценки состояния печени отмечены преимущества СКН в дозе 1,4 мг/кг перед препаратом сравнения.
  - 2. Установлена значительная антиоксидантная активность исследуемого вещества, которая проявилась как в существенном снижении показателей, свидетельствующих об активации ПОЛ при индуцированной патологии печени, так и о повышении эндогенной антиоксидантной активности тканей.
- 20 3. В условиях гипоксической гипоксии с гиперкапнией "Сосны кедровой настойка" показала антигипоксическую активность, статистически значимо удлинив жизнь мышей в замкнутом пространстве.
  - 4. В экспериментах с индуцированной гиперлипидемией (при поражении печени крыс четыреххлористым углеродом) исследуемое вещество оказывало отчетливое гиполипидемическое действие: предотвращалось нарастание в крови уровней ХС и ТГ; повышалось содержание антиатерогенных липопротеидов и снижались гидроперекиси в атерогенных апоВ-содержащих липопротеидах.

Изучение общетоксического действия настойки семян сосны кедровой сибирской При проведении токсикологических экспериментов руководствовались

- Методическими указаниями по изучению общестоксического действия фармакологических веществ (Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская Н.В. и др. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2000. С.18-24) и Методическими указаниями по доклиническому изучению новых препаратов, разрабатываемых из природного сырья
- б доклиническому изучению новых препаратов, разрабатываемых из природного сырья (Кукес В.Г., Булаев В.М., Колхир В.К. и др. Методические указания по доклиническому изучению новых препаратов, разрабатываемых из природного сырья // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2000. С.346-348). Животные (белые, половозрелые беспородные мыши и крысы)
  - были получены из питомника "Рапполово" Ленинградской области и содержались в условиях вивария на стандартной диете со свободным доступом к воде.

В рамках изучения общетоксического действия настойки семян сосны кедровой сибирской были проведены:

- 1. Оценка острой токсичности
- 2. Исследование хронической токсичности, включая влияние "Сосны кедровой настойки" на общее состояние животных, динамику массы тела и весовые коэффициенты органов, влияние "Сосны кедровой настойки" на функциональное состояние ЦНС, изучение влияния "Сосны кедровой настойки" на сердечно-сосудистую систему

- 3. Исследование влияния "Сосны кедровой настойки" на показатели периферической крови.
- 4. Изучение влияния "Сосны кедровой настойки" на биохимические показатели сыворотки крови
- 5 5. Исследование влияния "Сосны кедровой настойки" на состояние выделительной системы крыс
  - 6. Морфологическая оценка внутренних органов крыс в конце двухмесячного эксперимента
    - 7. Изучение местнораздражающего действия "Сосны кедровой настойки"
    - 8. Оценка аллергизирующих свойств "Сосны кедровой настойки"

10

25

Общие выводы по результатам общетоксического действия настойки семян сосны кедровой сибирской следующие:

- 1. "Сосны кедровой настойка" обладает низкой "острой" токсичностью. Определить ее ЛД50 при введении в деалкоголизированном виде не представлялось возможным: она превышала 75 мл/кг.
- 2. При получении "хронической" токсичности СКН (двухмесячное введение) ежедневные наблюдения за животными не выявили каких-либо отклонений в состоянии и поведении животных, не обнаружено существенных отличий биометрических показателей (масса тела, коэффициенты масс органов) животных опытных и контрольной групп. Длительное воздействие препарата не вызывало нарушений в составе периферической крови, функций печени, сердечно-сосудистой, центральной нервной и выделительной систем. У животных, длительное время получавших исследуемое вещество, не выявлено ни макро-, ни микроскопических отклонений в структуре внутренних органов от физиологических норм.
- 3. "Сосны кедровой настойка" не обладает раздражающим действием на слизистую оболочку желудка, так как после двухмесячного перорального введения препарата животным при макро- и гистологическом исследовании не было обнаружено патологических изменений как его слизистой оболочки, так и подслизистого слоя.
- 4. Эксперименты, проведенные на морских свинках с использованием двух тестов ("системная анафилаксия" и "конъюктивальная проба") для выявления аллергизирующего действия, показали, что двухнедельное введение исследуемого вещества не вызывало аллергизации животных.
- 5. Анализ литературных данных и результаты наших исследований позволяют считать, что "Сосны кедровой настойка" не обладает иммунотоксичностью. Об этом свидетельствуют:
- многовековой опыт применения семян сосны кедровой сибирской в народной медицине и пищевой промышленности;
- отсутствие сведений об аллергизирующих свойствах и иммунотоксичности у применяемого в медицинской практике эликсира Кедровит, основным компонентом которого являются семена СКС (В.Г. Макаров, 1999);
- результаты гематологических исследований, полученные при изучении "хронической" токсичности СКН; отсутствие изменений в содержании лимфоцитов, моноцитов, эозинофилов;
- результаты гистологической оценки важного иммунокомпетентного органа селезенки при проведении исследования "хронической" токсичности; отсутствие изменений массы и структуры его по сравнению с контролем.

Заключение и рекомендации по клиническому применению настойки семян сосны кедровой сибирской

Проведены экспериментальные (доклинические) исследования по изучению специфической активности "Сосны кедровой настойки" на двух видах животных (крысы и мыши) с использованием биометрических, биохимических и гистологических методов. Выявлено отчетливо выраженное гепатозащитное действие исследуемого вещества, сопоставимое с эффективностью гепатопротектора силибора.

У исследуемого вещества обнаружена выраженная антиоксидантная активность, что проявилось снижением индуцированного тетрахлорметаном увеличения генерации свободных радикалов, уровня ТБК-реагирующих продуктов в сыворотке крови и в печени, а также повышением активности ферментов антиоксидантной защиты: глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, каталазы, супероксиддисмутазы.

В условиях гипоксической гипоксии с гиперкапнией (замкнутое пространство) "Сосны кедровой настойка" оказала антигипоксическое действие.

На фоне индуцированной хроническим стеатогепатитом гиперлипидемии установлено гипохолестеринемическое действие СКН, а также увеличение сниженного содержания α-холестерина, отражающее нормализацию антиатерогенной фракции липопротеидов. Значительно снизилось содержание гидроперекисей в атерогенных (апоВ-содержащих) липопротеидах, что указывает на снижение их атерогенности.

В проведенных токсикологических исследованиях установлено, что "Сосны кедровой настойка" обладает низкой острой токсичностью - отсутствие гибели животных при применении максимально возможной (по объему) дозы; не отмечено кумулирующего действия препарата; в условиях хронического эксперимента СКН не оказывает раздражающего действия на слизистую оболочку желудка, не вызывает сдвигов в составе периферической крови, функциональных и морфологических нарушений печени, сердечно-сосудистой, выделительной и центральной нервной систем. Препарат не обладает аллергенной активностью.

Исходя из результатов проведенных исследований, "Сосны кедровой настойку" можно рекомендовать в качестве гепатопротектора растительного происхождения - лечебно-профилактического средства, повышающего резистентность ткани печени к различным повреждающим воздействиям.

#### Формула изобретения

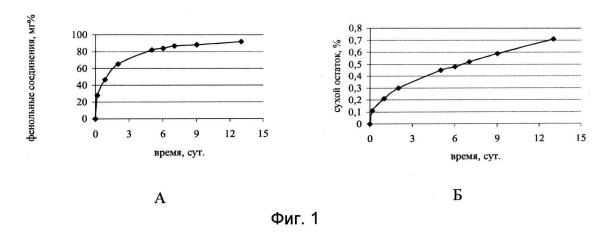
30

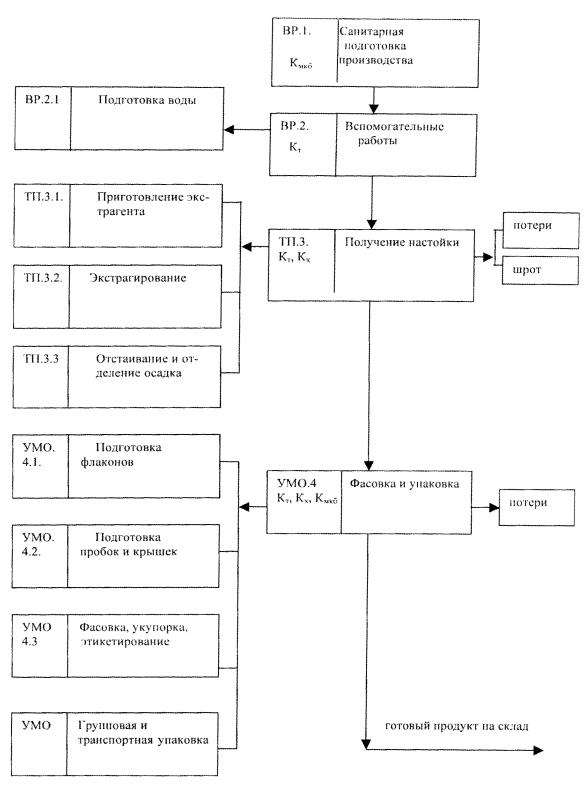
- 1. Способ получения настойки, обладающей гепатопротекторным, антиоксидантным, антигипоксическим, гиполипидемическим действием, из семян сосны кедровой сибирской мацерацией с использованием этилового спирта, отличающийся тем, что цельные семена сосны кедровой сибирской загружают в реактор, заливают экстрагентом в соотношении семена: экстрагент 1:5, причем в качестве экстрагента используют 70% водный раствор этилового спирта, экстрагирование проводят в течение 10-15 суток при комнатной температуре с ежедневным перемешиванием, получают настойку с содержанием спирта не менее 65% и сухого остатка не менее 0,5%, настойку отстаивают не менее двух суток при температуре 8-10°С и отделяют осадок для получения готового продукта.
- 2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что соотношение семена: экстрагент 1:5 обеспечивают с учетом коэффициента поглощения 1,15.
- 3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что получают настойку с содержанием суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту не менее 0,05%.
- 4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что осадок отделяют фильтрацией или декантацией.
  - 5. Лекарственный препарат, обладающий гепатопротекторным, антиоксидантным, антигипоксическим, гиполипидемическим действием, содержащий настойку семян сосны

### RU 2 545 700 C1

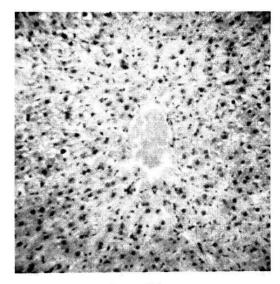
кедровой сибирской, полученную способом по п. 1. 6. Применение лекарственного препарата по п. 5 в качестве гепатозащитного средства.

Стр.: 21

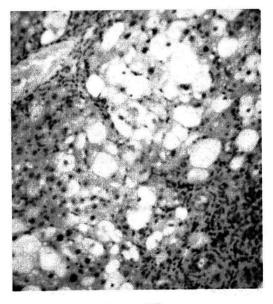




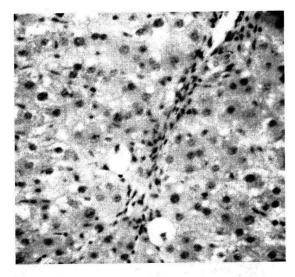
Фиг. 2



Фиг. ЗА



Фиг. 3Б



Фиг. 3В