

На правах рукописи

**БОЕВ
РОМАН СЕРГЕЕВИЧ**

**ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРНЕЙ ЛОПУХА
КАК ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ**

15.00.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

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

Томск – 2006

Работа выполнена в институте Химии нефти Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор химических наук Буркова Валентина Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор фармацевтических наук, профессор Краснов Ефим Авраамович
доктор фармацевтических наук, профессор Турецкова Вера Феопеновна

Ведущая организация:

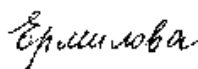
Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кемеровская медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Защита состоится 22 декабря 2006 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.04 при ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГОУ ВПО СибГМУ 634050, г. Томск, пр. Ленина, 107

Автореферат разослан « » ноября 2006 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета**



Ермилова Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Применение БАВ растительного происхождения в терапии многих заболеваний становится с каждым годом все более актуальным. Данная тенденция развития фармакологии связана, прежде всего, с потребностями практического здравоохранения. В частности, лекарственные средства растительного происхождения находят широкое применение в онкологической практике.

Преимущества использования растительных препаратов заключается в мягкости действия, малой токсичности и редком индуцировании аллергических реакций, что особенно важно в случае заболеваний, требующих длительного лечения.

Корни лопуха являются официальным лекарственным сырьем и рекомендуются в медицинской практике в качестве диуретического средства. В народной медицине извлечения из листьев и корней лопуха применяют как мочегонное, потогонное, кровоочистительное и противовоспалительное средства. В эксперименте доказано противоязвенное и адаптогенное действия экстракта корней лопуха.

Наше внимание привлекли работы зарубежных авторов и опыт народной медицины использования извлечений из лопуха для лечения онкологических заболеваний. Доказано противоопухолевое действие спиртового и дихлорметанового экстрактов корней лопуха при экспериментальных злокачественных опухолях на животных. Нами установлено, что концентрированный сок, полученный из свежих корней лопуха обладает не только цитостатической (останавливает рост и деление опухолевых клеток), но и апоптозиндуцирующей активностью (генетически программируемая гибель клеток). В связи с этим представляет интерес выделить и идентифицировать вещества, обуславливающие данные свойства водного экстракта корней лопуха.

Цель исследования. На основании химического и фармакологического исследований корней лопуха обосновать возможность использования водного экстракта лопуха в качестве противоопухолевого средства.

Задачи исследования:

1. Методами фитохимического анализа определить в корнях лопуха большого дикорастущего и культивируемого в условиях Сибири содержание основных групп биологически активных веществ.
2. Выделить из водного экстракта лопуха действующее вещество β -аспарагин и доказать его структуру.
3. Провести исследование противоопухолевых свойств, оценить острую токсичность водного экстракта лопуха и выделенного из него β -аспарагина.
4. Разработать методики качественного обнаружения и количественного определения β -аспарагина в корнях лопуха.
5. Изучить динамику накопления β -аспарагина в корнях лопуха в зависимости от фазы развития и места произрастания растения и определить сроки заготовки сырья.

6. Разработать проект нормативной документации (ФСП) «Лопуха корни свежие».

Научная новизна. Впервые проведено сравнительное фитохимическое исследование БАВ корней лопуха большого дикорастущего и культивируемого в условиях Сибири и показана их равнозначность. Из концентрированного водного экстракта корней лопуха большого впервые выделен и идентифицирован моноамид аспарагиновой кислоты – β -аспарагин, структура которого доказана элементным анализом (С,Н,N) и спектральными методами (ИК, ПМР). Исследована структурная и оптическая изомерии. Впервые показано, что β -аспарагин, выделенный из корней лопуха, обладает цитостатической и апоптозиндуцирующей активностью и является одним из компонентов, обуславливающих противоопухолевое действие водного экстракта данного сырья. Доказано, что концентрированный водный экстракт корней лопуха и выделенный из него β -аспарагин нетоксичны.

Разработаны методики качественного обнаружения и количественного определения β -аспарагина в корнях лопуха. Изучена динамика накопления β -аспарагина в корнях лопуха в зависимости от фазы вегетации и места произрастания растения, определены сроки заготовки сырья для получения биологически активных веществ противоопухолевого действия.

Практическая значимость.

Показана целесообразность стандартизации корней лопуха по β -аспарагину. Предложена методика стандартизации сырья лопуха по содержанию β -аспарагина методом ВЭЖХ. Разработан проект ФСП «Лопуха корни свежие».

Предложен оригинальный способ получения водного экстракта лопуха и выделения из него β -аспарагина. Получено положительное решение о выдаче патента на изобретение «Средство, обладающее цитостатической и апоптозиндуцирующей активностью» (№ 2005112031 от 23.10.2006 г.).

Концентрированный водный экстракт корней лопуха и выделенный из него β -аспарагин по результатам экспериментального изучения рекомендованы для дальнейших фармакологических исследований противоопухолевых свойств в комплексном лечении онкологических заболеваний. На основании полученных результатов предложены, зарегистрированы и налажен серийный выпуск: БАД «Экстракт корня лопуха» (ТУ 9154-059-20680882-06, Свидетельство о государственной регистрации №77.99.23.3.У.8925.8.06 от 23.08.2006.), Гель «Мамовит» (ТУ-9158-015-20680882-03, Сертификат соответствия РОС RY. АЮ 66. В 09761 от 07.02.06)

На защиту выносятся положения. Химический состав корней лопуха дикорастущего и культивируемого в условиях Сибири идентичен и представлен в основном полисахаридами и аминокислотами. Водный экстракт корней лопуха и выделенный из него β -аспарагин обладают противоопухолевой и антиметастатической активностью.

Апробация работы. Основные положения работы докладывались и обсуждались на Всероссийских конференциях: «Актуальные вопросы разработки и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов», Томск, 2004; «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья», Барнаул, 2005; Международном конгрессе молодых учёных «Науки о человеке», Томск, 2006; на проблемной комиссии СибГМУ «Изыскание и изучение новых лекарственных средств. Вопросы фармации», Томск, 23.10.2006.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Работа выполнена как инициативное исследование в соответствии с комплексной целевой программой СО АМН Российской Федерации «Здоровье человека в Сибири» (№государственной регистрации 01.9.2002479).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ и тезисов, из которых 1 статья в журнале, 1 положительное решение о выдаче патента на изобретение.

Экспериментальные исследования по теме диссертации выполнены в институте Химии нефти СО РАН, а также в сотрудничестве с коллективами других научных организаций: НИИ Органической химии СО РАН г. Новосибирск, НИИ Неорганической химии СО РАН г. Новосибирск, Центр сертификации и контроля качества лекарств Департамента здравоохранения г. Москвы и НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, НИИ Онкологии ТНЦ СО РАМН. Сотрудникам данных подразделений и научных учреждений приношу искреннюю благодарность. Особую признательность выражаю д.б.н. Уразовой Людмиле Николаевне.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 125 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, трех глав собственных исследований, выводов, списка литературы и Приложения. Работа иллюстрирована 28 таблицами и 20 рисунками. Библиографический указатель включает 135 источника литературы, из них 50 - зарубежной.

Во введении раскрыта актуальность темы, определены цель и задачи исследования, сформулированы научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе проведен анализ данных литературы о систематическом положении, ареале, местообитании и состоянии сырьевой базы видов рода лопух; приводятся сведения о химическом составе, применении в народной и научной медицине лопуха, экспериментальных исследованиях фармакологических свойств препаратов из лопуха.

Вторая глава посвящена характеристике объекта исследования, методик химического и фармакологического исследования, а также методик оценки подлинности и качества сырья.

В третьей главе представлены результаты изучения химического состава корней лопуха, качественное и количественное определение БАВ, выделение основного компонента β -аспарагина и установление его структуры.

Четвертая глава посвящена исследованию противоопухолевых свойств и острой токсичности водного экстракта корней лопуха и выделенного из него β -аспарагина.

В пятой главе представлены методики качественного и количественного определения β -аспарагина в корнях лопуха; обоснованы сроки заготовки корней лопуха по результатам изучения динамики накопления β -аспарагина в зависимости от фазы вегетации и места сбора растения; приведены результаты разработки товароведческих показателей и методик определения подлинности сырья лопуха по внешним и микроскопическим признакам.

В Приложении представлен проект Фармакопейной статьи предприятия «Лопуха корни свежие».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методики исследования

Объектом исследования являются корни лопуха большого (*Arctium lappa* L.), произрастающего на территории Томской области и Алтайского края и культивируемого в Алтайском крае.

Для исследований использовали свежие и сухие корни лопуха большого, собранные в местах его естественного произрастания в Томской области и Алтайском крае, а также с культурных плантаций в различные сроки вегетации в период 2004-2006 гг.

Для проведения химических исследований из образцов сырья лопуха большого получали в соответствии с методиками водные, водно-спиртовые извлечения 40% и 70% спиртом этиловым. Для фармакологических исследований использовали водный экстракт корней лопуха и выделенный из него аспарагин, полученные по оригинальной технологии.

Качественное и количественное определение различных групп биологически активных веществ (БАВ) проводили с помощью общепринятых в фитохимическом анализе методов: качественные реакции, хроматография в тонком слое сорбента, высокоэффективная жидкостная хроматография, элементный анализ, ИК- и ПМР-спектроскопия, рентгеноструктурный анализ, поляриметрия.

Морфологические признаки сырья изучали и описывали под стереоскопическим микроскопом МБС-10 (увеличения 8x1; 8x2; 8x4). Микроскопические признаки сырья устанавливали на основании анатомического исследования корней растения. Анализ цельного сырья проводили в соответствии со статьёй «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ XI, вып.1), для чего были приготовлены поперечные срезы. Для получения объективных результатов анализировали не менее десяти препаратов. Готовые препараты изучали под микроскопом МИКМЕД – 1 (увеличения 7x1, 5x8; 7x1, 5x40). Фотографировали с помощью цифрового фотоаппарата «LG» с оптическим адаптером и обрабатывали на компьютере в программе «Photoshop

8.0». Присутствие различных включений доказывали проведением общепринятых гистохимических реакций.

Для оценки качества сырья общепринятыми фармакопейными методиками определяли основные числовые показатели: содержание экстрактивных веществ, влажность, золу общую и нерастворимую в 10% растворе кислоты хлороводородной, содержание органической и минеральной примесей.

Тестирование апоптозиндуцирующего действия β -аспарагина проводили на опухолевых клетках карциномы Эрлиха по методу С.Н. Орлова.

Исследование влияния аспарагина на митотическую активность в системе *in vitro* проводили на культурах клеток эритромиелолейкоза человека (К-562) и аденокарциноме Эрлиха. Исследования противоопухолевой активности водного экстракта корней лопуха, L- β -аспарагина, полученного из корней лопуха и синтетического (пр-во Япония), проводили *in vitro* и на инбредных мышах линии С57В1/6 массой 18-20 г. В качестве моделей экспериментального опухолевого роста использовали штаммы перевиваемых солидных опухолей, метастазирующих в легкие: пигментный вариант меланомы В16 и карцинома легких Льюиса, полученные из банка опухолевых штаммов РОНЦ (Москва).

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятым методом с определением средней арифметической (\bar{X}) и ошибки средней арифметической (M). Достоверность результатов оценивали параметрически по *t*-критерию Стьюдента. Обработку результатов фармакологических исследований проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $P < 0,05$. Статистическую обработку проводили с использованием программы "Statistica for Windows 7,0".

Исследование химического состава корней лопуха

Нами разработаны приемы культивирования и созданы промышленные плантации лопуха большого на территории Алтайского края. В связи с этим представляло интерес провести сравнительное исследование химического состава корней лопуха большого культивируемого и дикорастущего. Содержание наиболее значимых для данного растения биологически активных веществ представлено в таблице 1.

Как видно из таблицы, в корнях лопуха содержатся фенольные соединения, представленные в основном фенолокислотами, полисахаридами, аминокислотами, сапонинами, в незначительных количествах - липофильными веществами. При этом можно отметить, что по содержанию данных групп БАВ корни лопуха дикорастущего и культивируемого растений практически не отличаются.

Наибольший интерес для нас представляло значительное содержание в корнях лопуха аминокислот. Известно, что аргинин и лизин могут являться индукторами апоптоза в нервной и лимфоидной тканях, а аспарагин -

индуктором апоптоза в нервной ткани. В связи с этим, одной из задач нашего исследования явилось более детальное изучение этой группы веществ.

Таблица 1

Результаты количественного определения БАВ в корнях лопуха большого дикорастущего и культивируемого

БАВ	Содержание, % от массы абс.- сухого сырья	
	Дикорастущий	Культивируемый
Фенольные соединения, в том числе:	9,05±0,02	8,43±0,02
• фенолокислоты	1,68±0,07	1,54±0,06
• кумарины	0,09±0,01	0,07±0,01
Сапонины	2,52±0,13	2,36±0,12
Полисахариды (сумма фруктозидов и фруктозанов):	34,60 ± 1,50	36,70±1,70
• фруктозиды	6,20 ± 0,30	7,10±0,40
• фруктозаны	28,40 ± 1,50	29,60±1,70
Витамин С, мг%	21,40±1,07	29,32±1,31
Каротиноиды, мг%	7,12±0,34	8,16±0,44
Липиды	0,91±0,15	1,15±0,21
Эфирное масло	0,16±0,12	0,21±0,14
Аминокислоты	8,82±0,36	9,87±0,40

Хроматографическое исследование аминокислот корней лопуха

Состав аминокислот корней лопуха исследовали методом тонкослойной хроматографии водного извлечения на пластинках «Сорбфил» размером 15x20 см, в качестве подвижной фазы смеси растворителей: н-бутанол- ледяная уксусная кислота- вода в соотношении 80 :20:20. Детекцию аминокислот проводили 0,2% спиртовым раствором нингидрина с последующим нагреванием пластинок при t 105°C до появления пятен. По хроматографическому поведению (значению R_f , окраске пятен в видимом свете после проявления нингидрином) сравнением с известными веществами в корнях лопуха установили присутствие аспарагина, аспарагиновой кислоты, глутамина, глутаминовой кислоты, гистидина, лизина, метионина и пролина (табл. 2).

Таблица 2

Хроматографическая характеристика аминокислот лопуха большого

Вещество	Значение R_f	Окраска пятен: видимый свет, нингидрин
Аспарагин	0,16	Красновато-коричневая
Аспарагиновая кислота	0,23	тёмно - розовая
Глутамин	0.11	оранжевая
Глутаминовая кислота	0,30	оранжевая
Гистидин	0.2	коричневая

Лизин	0,05	оранжевая
Метионин	0,51	красная
Пролин	0,28	жёлтая

Для более детального исследования связанных и свободных аминокислот качественное и количественное определение проводили методом ВЭЖХ. Исследовали образцы сырья дикорастущего и культивируемого лопуха. Анализировали водные экстракты, очищенные гексаном, хлороформом и этанолом. Для определения связанных аминокислот экстракт подвергали кислотному гидролизу. Гидролиз проводили в термостате в течение 20 часов при 105 °С. Использовали метод определения аминокислот (AccQ Tag), основанный на применении дериватизационного реагента, специально синтезированного для анализа аминокислот. Анализ проводили с помощью хроматографа "GILSON"321 (Франция) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы "Мультихром" для "Windows".

В качестве неподвижной фазы использовали металлическую колонку Waters AccQ Tag размером 3,9x150 мм. Детектирование проводили с помощью спектрофлуориметрического детектора JASCO-821-FP (США). Содержание аминокислот определяли методом абсолютной калибровки с помощью компьютерной программы "Мультихром" для "Windows".

По данным ВЭЖХ в очищенном водном извлечении корней лопуха обнаружено 20 аминокислот (рис. 1, 2), из них впервые идентифицированы: аспарагин, глютаминовая кислота, цистеин, 5-оксилизин.

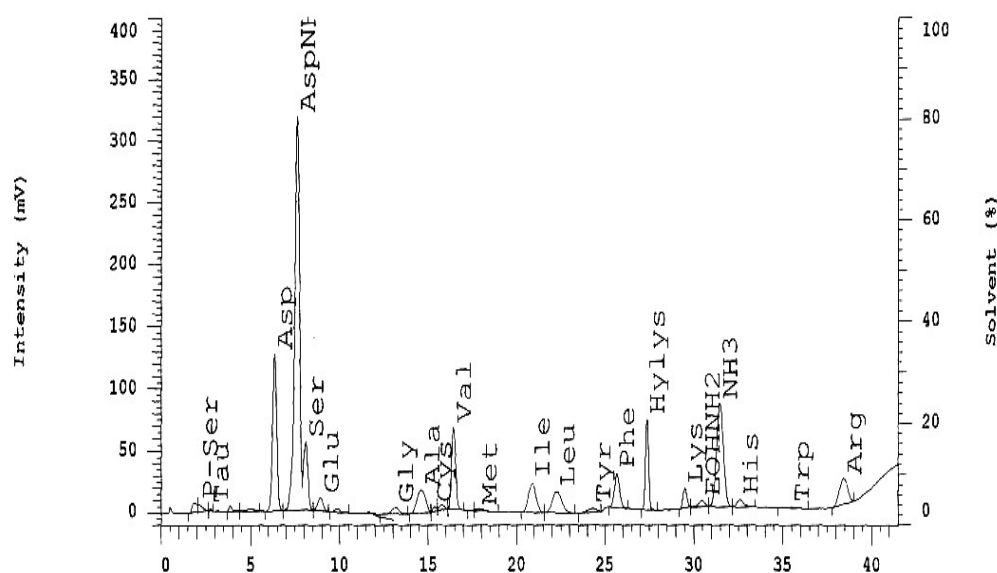


Рис. 1 – Хроматограмма водного экстракта корней лопуха культивируемого (свободные аминокислоты)

Установлено, что в корнях лопуха сумма свободных и связанных аминокислот составляет 12,46%, в том числе свободных - 10,1%. Как показывают результаты таблицы 3, качественный состав аминокислот корней

лопуха дикорастущего и культивируемого идентичны. В количественном соотношении аминокислот различия незначительны. Обнаружено, что в наибольшем количестве в свободном состоянии содержится аспарагин (6,4% в пересчёте на сырьё и до 50% в пересчёте на сумму аминокислот). Из данных литературы известно, что аспарагин обладает апоптозиндуцирующим действием, что является важной составляющей в механизме действия некоторых противоопухолевых препаратов.

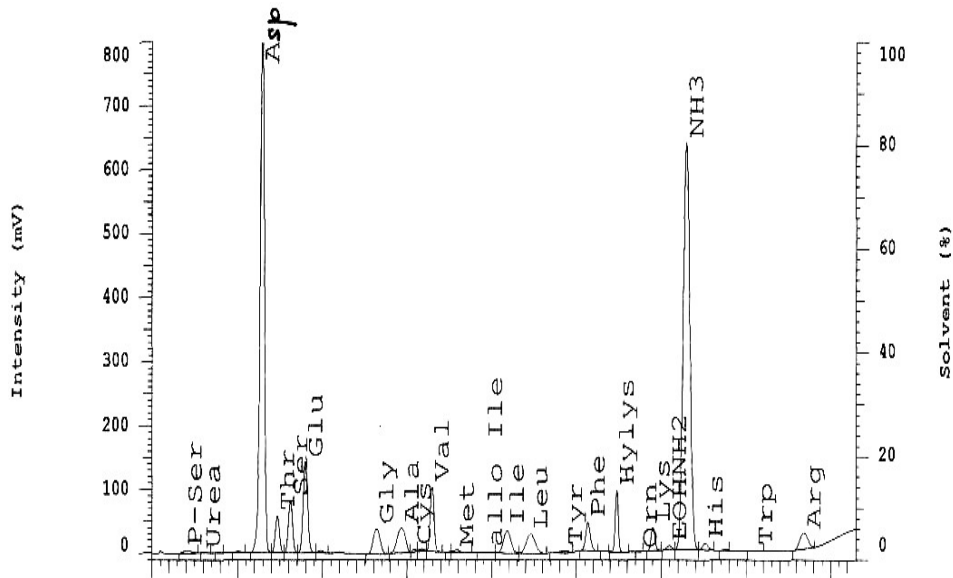
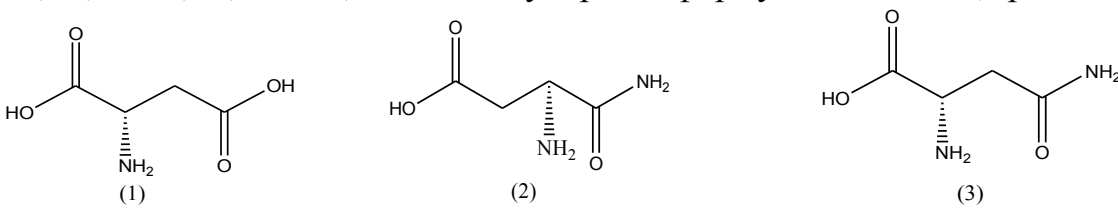


Рис.2 – Хроматограмма водного экстракта корней лопуха культивируемого после кислотного гидролиза (свободные и связанные аминокислоты)

Нами была поставлена задача выделить аспарагин из корней лопуха для исследования его противоопухолевых свойств. Аминокислоты являются водорастворимыми соединениями, поэтому аспарагин выделяли из водного экстракта корней лопуха. Аспарагин обладает низкой растворимостью - 2,46 г/л при 25°C, поэтому при концентрировании водного экстракта аспарагин выпадает в осадок.

Для выделения аспарагина использовали водный экстракт свежих гомогенизированных весенних корней лопуха второго года вегетации. Экстракт представляет собой светло-коричневую жидкость со сладковатым специфичным вкусом и запахом. Экстракт упаривали при пониженном давлении и температуре не выше 50°C до остаточной влажности не более 30%. Обнаружено, что в концентрированном экстракте в течение 10-20 дней выпадает значительное количество кристаллов. Размеры кристаллов от 1 до 52 мм. Форма и размеры кристаллов зависят от условий кристаллизации: концентрации раствора, скорости понижения температуры, времени процесса кристаллизации.

После двукратной перекристаллизации из воды получали бесцветные ромбические кристаллы, для которых определяли элементный состав %: С 35,20; Н 6,48; N 22,60. Молекулярная формула вещества, рассчитанная по



данным элементного анализа, соответствует формуле аспарагина - моноамида аспарагиновой кислоты (1). В зависимости от положения аминогрупп по отношению к амидной различают α (2)- и β (3)-аспарагин.

Таблица 3

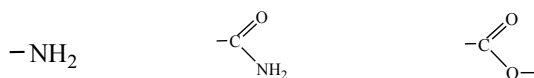
Результаты определения свободных и связанных аминокислот в корнях лопуха методом ВЭЖХ

Наименование	Содержание аминокислот, % на абс.- сухую массу сырья			
	лопух культивируемый		лопух дикорастущий	
	свободн. и связанные	свободные	свободн. и связанные	свободные
Аспарагиновая кислота(Asp)	7,381	0,704	7,073	0,748
Треонин (Thr)	0,2480	-	0,1804	0,055
Аспарагин (AspNH ₂)	-	6,358	-	5,456
Серин (Ser)	0,3223	0,2436	0,3234	0,1958
Глутаминовая кислота (Glu)	0,8712	0,0825	0,6985	0,088
Пролин (Pro)	0,6627	0,6292	0,6897	0,6022
Глицин (Gly)	0,187	0,0253	0,1826	0,0192
Аланин (Ala)	0,2821	0,1479	0,3217	0,1237
Цистеин (Cys)	0,0291	0,0302	0,0231	0,0163
Валин (Val)	0,4064	0,2997	0,2926	0,2051
Метионин (Met)	0,0346	0,0231	0,0528	0,0231
Изолейцин (Ile)	0,3014	0,2238	0,1842	0,1721
Лейцин (Leu)	0,3217	0,2062	0,3239	0,1589
Тирозин (Tyr)	0,0412	0,0555	0,0638	-
Фенилаланин (Phe)	0,3008	0,2139	0,2524	0,1985
5-Оксилизин (HyLys)	0,4301	0,3635	0,3899	0,3487
Орнитин (Orn)	0,0066	-	-	-
Лизин (Lys)	0,1721	0,0786	0,0995	0,0907
Гистидин (His)	0,077	0,0610	0,0726	0,0528
Аргинин (Arg)	0,3817	0,3404	0,3437	0,3311
Сумма	12,475	10,0864	11,5678	8,8852

Примечание: знак «-»-вещество не обнаружено.

Поскольку α -аспарагин получают синтетическим путем, а в животных и растительных тканях содержится β -аспарагин преимущественно в L-форме, можно предположить, что из экстракта корней лопуха выделен β -аспарагин. Доказательство его структуры проведено спектральными методами.

В ИК-спектре исследуемого вещества (рис.3) имеются полосы поглощения, подтверждающие наличие функциональных групп:



В области валентных колебаний N-H в первичных аминах наблюдаются полосы поглощения 3455 и 3382 см^{-1} . Амидная группа проявляется в спектре полосой валентных колебаний NH при 3111 см^{-1} и деформационных колебаний NH при 1644 см^{-1} (полоса Амид II), характерных для первичных амидов, вторая область проявления этих колебаний находится в области меньших частот, при 1429 см^{-1} (полоса Амид III). Валентные колебания карбонильной группы (C=O) амидов обнаружены при 1682 см^{-1} (полоса Амид I). Область 1500 - 1700 см^{-1} содержит ряд интенсивных полос, отнесенных, как указано выше, к полосам Амид I, II, III, полоса 1578 см^{-1} соответствует валентным колебаниям C=O в ионизированном карбоксиле аминокислоты, что указывает на цвиттер-ионную структуру аспарагина. Полоса деформационных колебаний NH в $^+\text{NH}_3$ – группе при 1528 см^{-1} также подтверждает цвиттер-ионную структуру. Уширенная полоса поглощения при 669 см^{-1} соответствует деформационным колебаниям N-H в аминах.

ИК-спектр хлоргидрата аспарагина свидетельствует об исчезновении цвиттер-ионной структуры, в спектре имеются полосы валентных колебаний C=O в неионизированном карбоксиле аминокислот при 1730 см^{-1}

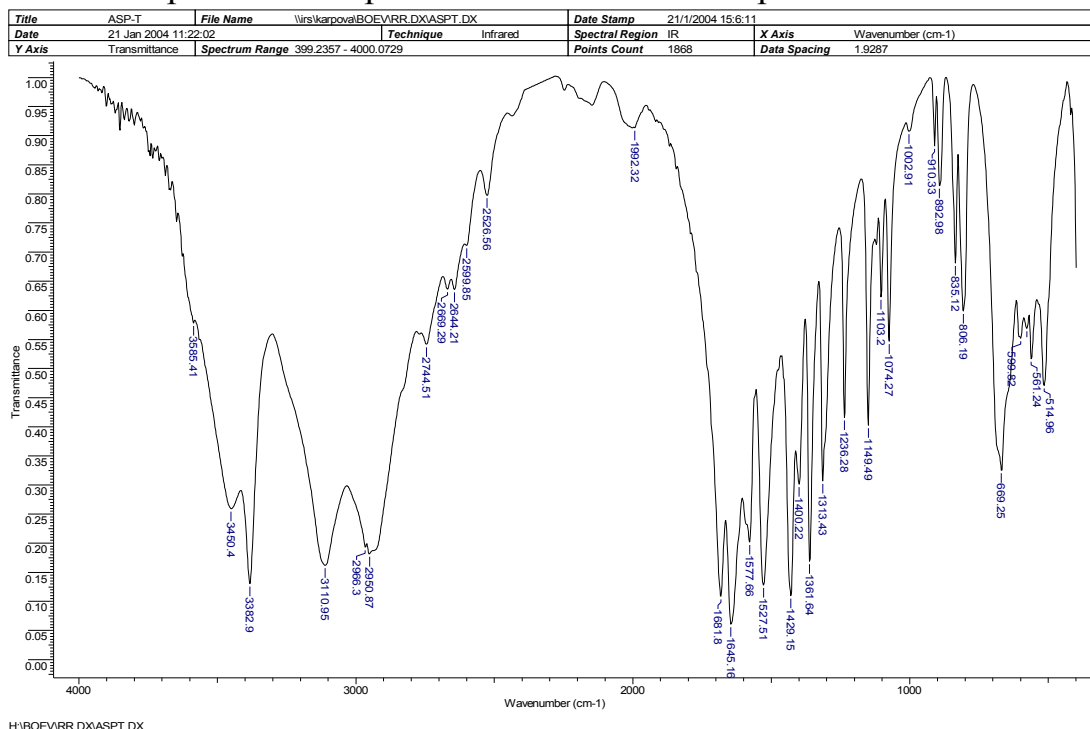


Рис. 3 – ИК-спектр аспарагина, выделенного из экстракта корней лопуха

В ПМР-спектре соединения (рис.4) проявляются резонансные сигналы протонов аминогруппы при 7,85 м.д., протонов амидной группы при 7,60 м.д. и 6,86 м.д. Дублет дублетов с химсдвигом 4,0 м.д. ($J_1=4$ Гц, $J_2=8$ Гц) относится к метиновому протону. Его мультиплетность свидетельствует о неэквивалентности соседних метиленовых протонов. Расчет части спектра, относящейся к метиленовым протонам, дал следующие параметры: сигнал одного из метиленовых протонов имеет химсдвиг 2,94 м.д. ($J_1=4$ Гц), второго – 2,84 м.д. ($J_2=8$ Гц), абсолютное значение константы спин-спинового взаимодействия между метиленовыми протонами составляет 17 Гц.

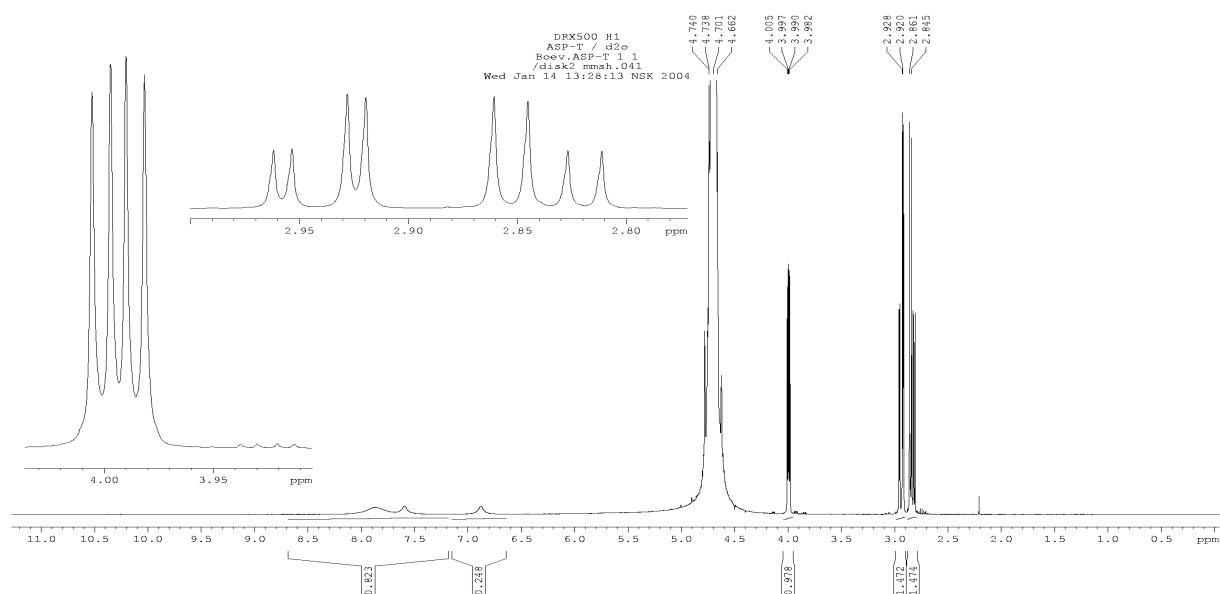


Рис. 4 – ПМР-спектр аспарагина, выделенного из экстракта корней лопуха

Для подтверждения структуры β -аспарагина, выделенного из корня лопуха, был проведён его рентгеноструктурный анализ в сравнении с синтетическим β -аспарагином (пр-во Япония). Рентгеноструктурный анализ образцов не позволил выявить существенных различий в длинах связей и валентных углах превышающих погрешность прибора.

Таким образом, установлено, что из водного экстракта корней лопуха второго года вегетации выделен β -аспарагин.

Аспарагин имеет хиральный центр, поэтому обладает оптической активностью. Существует два оптических антипода L- β -аспарагин и D- β -аспарагин. Для установления пространственной изомерии β -аспарагина необходимо выяснить в какую сторону выделенный аспарагин вращает плоскость поляризованного света. Для сравнения с выделенным β -аспарагином проанализировали синтетические образцы D-аспарагина, L-аспарагина и D,L-аспарагина (табл. 4).

Удельное вращение изомеров аспарагина

Вещество	$[\alpha]_{578}^{19}$ (с 1,3 Н ₂ О)
β -аспарагин (корень лопуха)	-7.69
D-аспарагин	+9.23
L-аспарагин	-6.15
D,L-аспарагин.	0.0

По данным показателя удельного вращения выяснено, что из водного экстракта корней лопуха выделен L- β -аспарагин.

Оценка фармакологической активности и безвредности водного экстракта корней лопуха и аспарагина

В соответствии с поставленными задачами оценивали «острую» токсичность водного экстракта корней лопуха, выделенного из него аспарагина и синтетического аспарагина (пр-во Япония). В эксперименте на мелких грызунах исследуемые препараты обладали весьма низкой «острой» токсичностью. Экстракты корня лопуха и аспарагин (природный и синтетический) при однократном введении в желудок нетоксичны и относятся к группе «мало опасных веществ».

Исследование противоопухолевой активности на культурах клеток

Задачей нашего исследования была оценка противоопухолевой активности водного экстракта корней лопуха и выделенного из него аспарагина.

Тестирование апоптозиндуцирующего действия β -аспарагина проведено на опухолевых клетках карциномы Эрлиха по методу С.Н. Орлова. Полученные данные свидетельствуют о том, что β -аспарагин, выделенный из корней лопуха, обладает дозозависимым апоптозиндуцирующим влиянием на опухолевые клетки. Наибольшая активность аспарагина проявляется при концентрации 0,5 мг/мл, при которой индукция апоптоза достигает 87%, при концентрации 0,05 мг/мл индукция апоптоза - 5,4%.

Результаты изучения влияния L- β -аспарагина (из корней лопуха) в сравнении с синтетическими образцами: L- β -аспарагина, D- β -аспарагина и DL- β -аспарагина на митотическую активность клеток эритромиелолейкоза человека (К-562) в системе *in vitro* позволяют сделать вывод, что митотическая активность опухолевых клеток подавляется как природным, так и синтетическим аспарагином, причем, прослеживается прямая корреляционная зависимость изученного показателя от дозы препарата и времени инкубации (рис. 5,6).

Исследование действия вышеуказанных препаратов на степень роста клеток аденокарциномы Эрлиха *in vitro* показало четкую корреляционную зависимость индекса ингибирования роста клеток от применяемой дозы препарата (рис. 7).

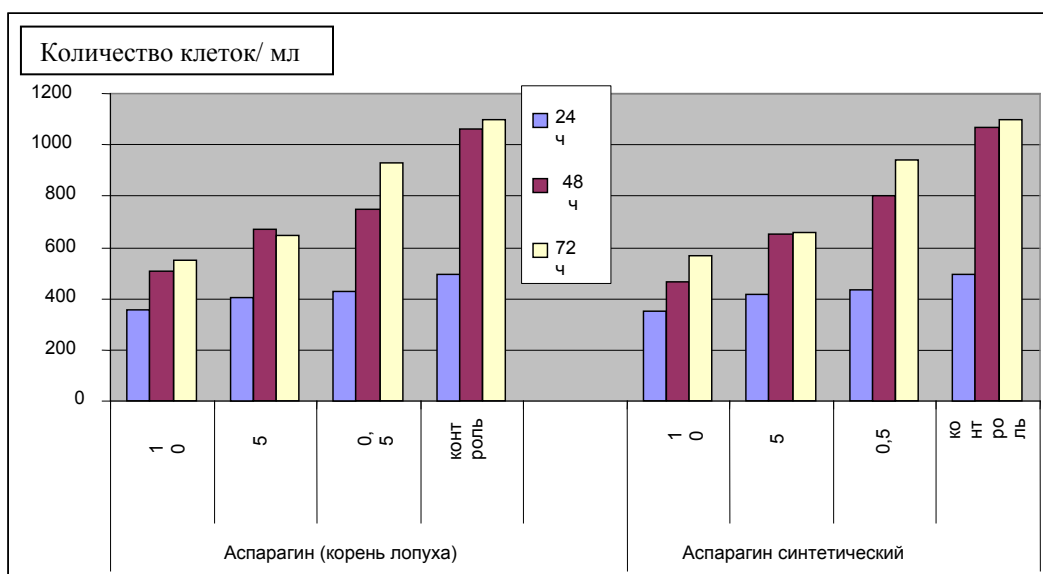


Рис. 5 – Влияние аспарагина на динамику роста клеток K562 in vitro

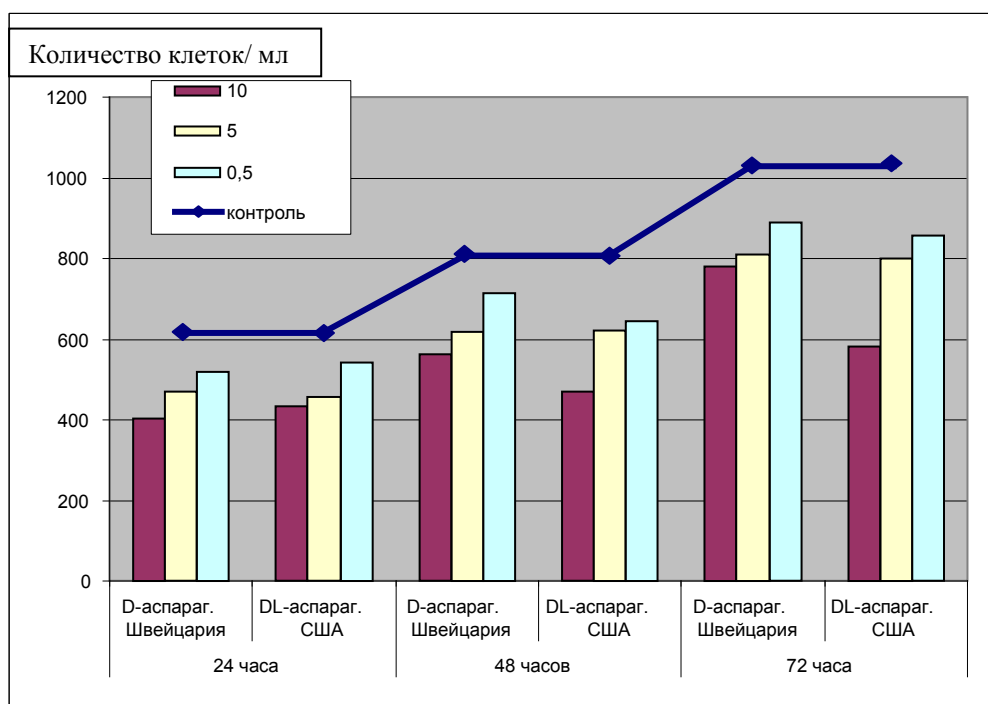


Рис. 6 – Влияние изомеров аспарагина на рост клеток K-562 in vitro

Торможение роста клеток опухоли Эрлиха выражено более отчетливо, чем штамма K-562, что свидетельствует об избирательности ингибирующего воздействия изученных препаратов в отношении различных опухолевых штаммов. При сравнении противоопухолевого действия различных изомеров аспарагина показано, что наиболее выраженное торможение роста клеток оказывает природный L-аспарагин, выделенный из экстракта корней лопуха, ИМ до 64,9%.

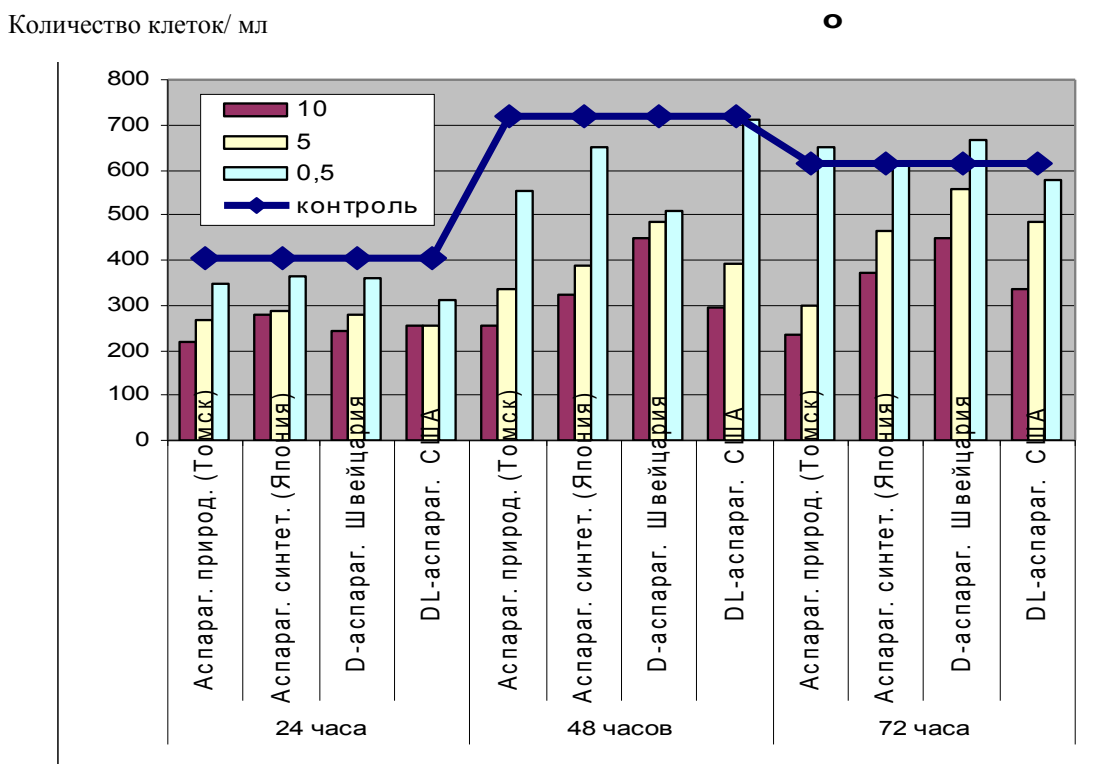


Рис. 7 – Влияние изомеров аспарагина на рост клеток аденокарциномы Эрлиха in vitro

Исследование противоопухолевой активности на перевиваемых опухолях животных

Проведенные исследования показали статистически значимое торможение роста карциномы Льюиса на ранних стадиях онкогенеза (7-11 сутки наблюдения) в группах животных, получавших препараты аспарагина в дозе 1000 мг/кг (табл. 5). При этом природный аспарагин в указанные сроки вызывал 18,6-31,0 % торможения роста опухоли, а синтетический – 18,9-33,0%.

Исследование влияния аспарагина на метастазирование карциномы легких Льюиса показало значимое ингибирование метастазирования на ранних стадиях онкогенеза при терапии животных синтетическим аспарагином (до 28,8%). При этом природный аспарагин практически не подавляет, а в отдельных случаях стимулирует метастазирование. На более поздних стадиях процесса происходит незначительное ингибирование метастазирования природным аспарагином (до 15,4%) и стимуляция синтетическим.

Для подтверждения антиметастатической активности препарата обязательным условием является использование, по крайней мере, двух из общепринятых моделей метастазирования, применяемых в экспериментальной онкологии. В качестве второй экспериментальной опухоли выбрана меланома В16.

Установлено статистически значимое торможение роста меланомы В16 на 10 и 15 сутки эксперимента в группах животных, получавших аспарагин в дозе 500 мг/кг (табл.6).

Таблица 5

Влияние аспарагина на динамику роста карциномы легких Льюис

Сутки	Группы животных, объем опухоли см ³ , ТРО%			P	P ₁	P ₂
	LLC	LLC+аспар.Томск-1г	LLC+аспар.Япон-1г			
7	1,3±0,12	0,9±0,13; 31,0%	0,87±0,09; 33,0%	0,03	0,003	0,81
9	2,09±0,17	1,61±0,16; 22,97%	1,84±0,17; 11,97%	0,026	0,068	0,69
11	3,39±0,17	2,76±0,23; 18,58%	2,75±0,2; 18,88%	0,039	0,0001	0,51
14	3,51±0,24	3,27±0,29; 6,84%	3,75±0,11; 6,84%	0,43	0,65	0,2
16	4,51±0,26	3,63±0,4; 19,51%	4,69±0,21; 3,99%	0,12	0,92	0,13
19	5,79±0,3	5,69±0,23; 1,73%	5,295±0,15; 1,73%	1,0	0,39	0,2

Примечания: достоверность различий с группой LLC: P – группы 1; P₁- группы 2; P₂- достоверность различий между группами 1 и 2

Аналогичные результаты получены на 8 и 10 сутки в группе мышей, получавших аспарагин в дозе 250 мг/кг. Следует отметить, что на 13 сутки после перевивки опухоли торможение ее роста снизилось до 4,3-6,6% в зависимости от дозы препарата. Затем к 15 суткам эксперимента, данный показатель несколько повысился (до 7,9-11,2%). При этом объемы опухолей животных контрольной группы значительно превышали аналогичные показатели в опытных группах (табл.6). Выявлено достоверно выраженное ингибирование метастазирования на 13, 15 сутки эксперимента (75-80%, 42-91%, соответственно). Представляет интерес феномен обратной пропорциональной зависимости между дозой препарата и антиметастатическим эффектом, который очень четко выражен на 15 сутки эксперимента (рис.8).

Таблица 6

Влияние аспарагина на динамику роста меланомы В16

Сутки	Группы животных							
	В16	В16 + аспарагин (500 мг/кг)			В16 + аспарагин (250 мг/кг)			
	V	V	ТРО	P	V	ТРО	P	P ₁
8	0,54±0,08	0,36±0,06	33,33%	0,09	0,35±0,07	35,19%	0,03	0,94
10	1,98±0,18	1,64±0,08	17,17%	0,05	1,7±0,12	14,21%	0,14	0,69
13	3,48±0,17	3,01±0,1	6,61%	0,07	3,33±0,13	4,31%	0,5	0,4
15	4,83±0,07	4,29±0,15	11,18%	0,03	4,45±0,1	7,87%	0,02	0,3

Примечания: V – объем опухоли (см³); ТРО – торможение роста опухоли; достоверность различий: P – с группой «В16»; P₁- между опытными группами.

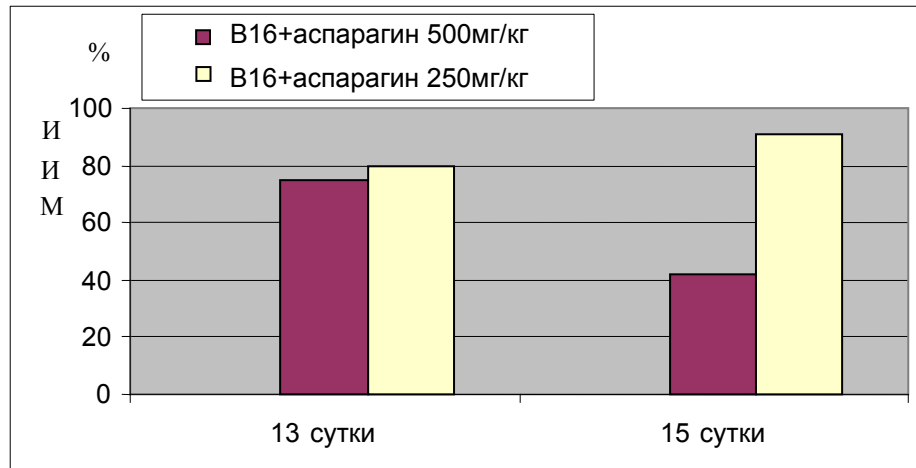


Рис. 8 – Индекс ингибирования метастазирования

Исследования противоопухолевой активности аспарагина корня лопуха на модели карциномы Льюиса показали низкую противоопухолевую и антиметастатическую активность препарата (1000 мг/кг). Однако, аналогичные исследования, проведенные в отношении меланомы B16, показали, что при невысокой активности препарата в отношении первичного опухолевого узла чрезвычайно высок уровень ингибирования метастазирования (до 91%) в зависимости от применяемой схемы терапии и сроков наблюдения.

На модели перевиваемой карциномы Льюиса показано достоверное торможение ее роста водным экстрактом корней лопуха, содержащим аспарагин (11%) в комплексе с другими БАВ (табл.7).

Таблица 7

Влияние водного экстракта корней лопуха на динамику роста карциномы Льюиса

Сутки	Объем опухоли, см ³	
	LLC	LLC + экстракт 1000мг/кг
6	0,74±0,08	0,55±0,07
9	2,38±0,12	1,67±0,17
12	3,66±0,09	3,11±0,15
15	4,38±0,2	3,54±0,17
19	5,53±0,23	4,87±0,21

Исследование влияния препаратов лопуха на метастазирование карциномы легких Льюиса показало, что происходит отчетливо выраженное ингибирование метастазирования на ранних стадиях онкогенеза ИИМ – 59,8%, на поздних ИИМ – 52,0%.

Анализ результатов свидетельствует о том, что водный экстракт корней лопуха проявляет выраженную противоопухолевую и антиметастатическую активность. Аспарагин проявляет противоопухолевые и антиметастатические потенции, колебания которых зависят, как от экспериментальной модели, так и от дозы препарата и сроков наблюдения. Таким образом, есть основание

утверждать, что аспарагин является одним из БАВ водного экстракта корней лопуха, обуславливающих его противоопухолевые свойства.

Поскольку высокое содержание аспарагина характерно не для многих растений, нами предложено проводить стандартизацию сырья корней лопуха, предназначенного для получения биологически активных комплексов противоопухолевого действия, по содержанию β -аспарагина.

Разработка методик стандартизации корней лопуха свежего

Для рекомендации корней лопуха в качестве источника противоопухолевых БАВ необходимо было разработать методики его стандартизации, которые включают качественное и количественное определение основных действующих веществ. Кроме того, для сырья регламентируются показатели влажности, золы и примесей; для определения подлинности свежих корней лопуха необходимо было уточнить их морфологические и микроскопические признаки.

Определение аспарагина

Для качественного обнаружения аспарагина в сырье использовали реакцию, основанную на свойстве аспарагина подвергаться гидролизу под действием щелочей с образованием аспарагиновой кислоты и аммиака, обнаруживающегося по запаху и по изменению цвета влажной лакмусовой бумажки.

Для количественного определения аспарагина в корнях лопуха использовали упрощенный вариант фармакопейного метода определения азота по Кьельдалю.

Также для качественного и количественного определения аспарагина в корнях лопуха предложен метод ВЭЖХ. Аспарагину соответствует пик высокой интенсивности со временем удерживания 7,5 мин при стандартных условиях анализа свободных аминокислот и белковых гидролизатов.

Изучена динамика накопления аспарагина в корнях лопуха в зависимости от фазы вегетации и места сбора сырья. Анализ данных позволяет сделать вывод, что накопление аспарагина происходит уже к концу первого года вегетации. Наибольшее содержание аспарагина обнаружено в культивируемых растениях. Второй год вегетации характеризуется быстрым уменьшением содержания аспарагина, за 5 месяцев вегетации содержание аспарагина уменьшается более чем в 6 раз (табл. 9). Поэтому заготовку корней рекомендуем проводить в первый месяц второго года вегетации растения.

Кроме того, для корней лопуха свежих определены числовые показатели (влажность, зола, примеси), а также методики определения подлинности сырья по внешним и микроскопическим признакам. На основании полученных результатов разработан проект ФСП «Лопуха корни свежие»

Таблица 9

Динамика накопления аспарагина в корнях лопуха первого и второго года вегетации в Томской области и Алтайском крае

Содержание аспарагина, % на абс.- сухую массу сырья.					
Дата сбора и место сбора		Алтайский край, с.Алтайское		Дата сбора	Томская область, с. м. Протопопово
		Дикорастущий	Культивированный		Дикорастущий
Первый год вегетации	11.09.04	2,58±0,06	2,87±0,06	15.09.04	2,51±0,06
	26.09.04	3,26±0,07	3,49±0,08	28.09.04	3,95±0,09
	30.10.04	4,13±0,09	4,67±0,10	25.10.04	4,56±0,10
Второй год вегетации	14.04.05	6,17±0,14	6,64±0,15	05.05.05	6,32±0,14
	18.04.05	6,29±0,14		10.05.05	5,13±0,11
	22.04.05	5,36±0,12	5,49±0,12	20.05.05	4,25±0,09
	27.04.05	4,73±0,10	4,51±0,10		
	30.04.05	4,52±0,10		29.05.05	
	09.05.05	3,12±0,07		07.06.05	3,18±0,07
	14.05.05		3,17±0,07	13.06.05	2,34±0,05
	18.05.05	3,24±0,07		26.06.05	1,95±0,04
	27.05.05	2,89±0,06	2,81±0,06		
	24.06.05		1,83±0,04	17.07.05	1,79±0,04
	30.06.05	1,62±0,04	1,56±0,03		
	09.07.05	1,35±0,03		24.08.05	1,25±0,03
	12.08.05	1,26±0,03			
26.09.05	1,03±0,02	1,08±0,02	29.09.05	1,14±0,03	

ВЫВОДЫ

1. В результате химического исследования свежих корней лопуха обнаружены: полисахариды ($34,6 \pm 1,5\%$), из них фруктозиды ($6,2 \pm 0,3$), фруктозаны ($28,4 \pm 1,5$); фенольные соединения ($9,05 \pm 0,02\%$), включающие фенолокислоты ($1,68 \pm 0,07\%$) и кумарины ($0,09 \pm 0,01\%$); сапонины ($2,52 \pm 0,13\%$); аминокислоты ($8,82 \pm 0,36\%$). Установлено, что качественный состав дикорастущего и культивированного лопуха идентичны. В количественном соотношении по основным группам БАВ различия незначительны.

2. Из водного экстракта свежих корней лопуха впервые выделен L- β -аспарагин, структура которого доказана элементным анализом, ИК- и ПМР-спектроскопией, рентгеноструктурным анализом и поляриметрией.

3. В экспериментальных исследованиях на культурах клеток (эритромиелолойкоза К-562, карцинома Эрлиха) и на моделях перевиваемых опухолей, метастазирующих в легкие (пигментный вариант меланомы В16, карцинома легких Льюиса) показано противоопухолевое действие водного экстракта корней лопуха и выделенного из него L- β -аспарагина.

4. Обоснована необходимость стандартизации корней лопуха свежих по аспарагину, как одному из веществ, обуславливающих противоопухолевые свойства водного экстракта корня лопуха; предложены методики качественного обнаружения и количественного определения аспарагина двумя методами (упрощенный метод определения азота по Кьельдалю и метод ВЭЖХ).
5. Изучение динамики накопления аспарагина в корнях лопуха показало, что оптимальным сроком заготовки сырья является первый месяц второго года вегетации растения.
6. С помощью анатомо-морфологического исследования установлены диагностические признаки сырья для определения его подлинности, получены достоверные фотоиллюстрации микроскопических признаков.
7. Разработаны числовые показатели сырья для цельных корней лопуха свежих: содержание аспарагина не менее 3%; содержание экстрактивных веществ, извлекаемых водой, не менее 40%; влажность не более 80%; золы общей не более 10%, золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлороводородной не более 1%; других частей растения не более 2%; органической примеси не более 1%; минеральной примеси не более 1%.
8. На основании полученных результатов разработан проект Фармакопейной статьи предприятия «Лопуха корни свежие».

ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ СЛЕДУЮЩИЕ РАБОТЫ:

1. Вещество с цитостатической и апоптозиндуцирующей активностью из корней лопуха // Химия в интересах устойчивого развития. - 2005 - № 1. - С. - 119-122.

2. Апоптозиндуцирующая и цитостатическая активность концентрированного сока корня лопуха // Материалы конференции. «Актуальные вопросы разработки и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов». - Томск, 2004. - 276с. (Соавт. В.М. Плотников).

3. Новое вещество из корней лопуха // Материалы II Всероссийской конференции «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья». – Барнаул, 2005. - С.311-315. (Соавт. В.Н.Буркова, Г.А.Терентьева)

4. Противоопухолевая активность корней лопуха // Сборник статей по материалам VII конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». – Томск, 2006. - С.128-129.

5. Вещество с цитостатической и апоптозиндуцирующей активностью. // Положительное решение о выдаче патента № 2005112031 от 23.10.2006 г, приоритет №2004103437 от 05.02.2004. (Соавт. С.Г. Боев, В.Н Буркова., В.М. Плотников, Г.А. Терентьева).

Список сокращений

ФСП - фармакопейная статья предприятия;

ИК - инфракрасный спектр;

ПМР - протонный магнитный резонанс;

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография;

ТУ - технические условия;

БАВ - биологически активное вещество;

ИМ - митотический индекс;

ТРО - торможение роста опухоли;

ИИИ - индекс ингибирования метастазирования.