

Никифоров Леонид Анатольевич

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
ПОДСЕМЕЙСТВА РЯСКОВЫЕ (*LEMNOIDEAE*)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

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

Научный руководитель:

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

Официальные оппоненты:

Шмыгарева Анна Анатольевна, доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии, заведующий кафедрой;

Марахова Анна Игоревна, доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», институт биохимической технологии и нанотехнологии, профессор.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа.

Защита диссертации состоится «__» _____ 202_ г. в 1_.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2022_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат фармацевтических наук,
доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В последние годы популярность фитотерапии, несмотря на большие успехи в создании синтетических лекарств, возрастает. Интерес к природным веществам и препаратам, создаваемым на их основе, увеличивается благодаря как общеизвестным уникальным свойствам фитопрепаратов, так и стремительно развивающимся технологиям исследований в биологии, медицине и производстве лекарственных препаратов, позволяющим эффективно решать вопросы поиска, оценки, стандартизации и внедрения перспективных объектов (Самбукова, Т. В., 2017). Конкурентными преимуществами фитопрепаратов являются их высокий терапевтический индекс, широкий спектр терапевтического действия, комплексный протекторный эффект, что актуализирует их использование в превентивной и регенеративной медицине, в комплексной терапии хронических заболеваний, в педиатрии и гериатрии.

Перспективными объектами для изучения, благодаря обеспеченной и быстро возобновляемой сырьевой базе, доступности и возможности заготовки значительных объемов сырья, как в дикорастущем виде, так и в аквакультуре, а также данным успешного применения в традиционной медицине, являются произрастающие на территории России отдельные представители подсемейства рясковые – ряска малая (*Lemna minor* L.), ряска тройчатая (*Lemna trisulca* L.), многокоренник обыкновенный (*Spirodella polyrrhiza* Schleid (*Lemna polyrrhiza* L.)) (Власова Н.В., 1987, Петрова Н.В., 2014).

Несмотря на хорошую изученность данных растений, в Российской Федерации до сих пор отсутствует нормативная документация на лекарственное растительное сырьё, что значительно ограничивает их применение.

Поэтому, данные растительные объекты являются перспективными для комплексного фармакогностического исследования. Изучение химического состава, фармакологических свойств биологически активных соединений (БАС) с последующей разработкой нормативной документации (НД) на лекарственное растительное сырьё является актуальным.

Степень разработанности темы исследования.

Обращение к крупнейшей в мире базе данных рефератов и цитирования Scopus, по ключевым словам, «*Lemnaceae*», «*Lemna*» показывает более 400 и 3800 публикаций, что говорит о большом интересе зарубежных и отечественных ученых к рассматриваемым объектам. Из 410 ссылок по ключевому слову «*Lemnaceae*» в базе Scopus 289 относятся к области сельского хозяйства, 96 - к наукам об окружающей среде, 119 – к биохимии, генетике и молекулярной биологии, в то же время, на химические науки и фармакологию приходится всего 20 и 15 публикаций соответственно.

Анализ содержания публикаций, представленных, как в базе данных Scopus, так и других информационно-поисковых системах, показал, что наиболее часто модельными объектами исследований зарубежных и отечественных ученых

являются *L. minor* (≈60-65% исследований), *Spirodella SP.* (≈20-25%), на остальные виды *L. gibba*, *L. minuta*, *L. aequinoctalis*, *L. japonica*, *Wolfia Spp.* приходится ≈15-20%. Большая часть публикаций, относящихся к разным базам данных в области знаний «химия», посвящена влиянию воздействия металлов, в том числе тяжелых металлов, наночастиц металлов на уровни их накопления в растениях, внутривидовую вариабельность, экологические риски, устойчивость к «металлическому» стрессу (Hartt, D.A. et al., 1970, Popov, S.V. et al., 2006, Anawar, H.M. et al., 2008, Fikirdeşici-Ergen, Ş. et al., 2018, Minogiannis, P. et al., 2019, Lalau, C. M. et al., 2020.). Кроме того, изучаются различные аспекты культивирования рясок, влияния солевого стресса на биохимические и физиологические аспекты, влияния гербицидов на ряски, на их способность дезактивировать в воде токсиканты ароматического ряда (Buikema Jr., A.L. et al., 1979, Chung, I.-M. et al., 2007, Kuznetsova, T. et al., 2019, Mariani, F. et al., 2020.)

По литературным данным представители подсемейства рясковые, обладают противовоспалительным, гастропротективным, желчегонным, антимуtagenным, антиоксидантным, антирадикальным, цитотоксическим, антикоагулянтным, антимикробным, антиадипогенезным, криопротекторным, противоопухолевым действием, проявляют адсорбирующую активность, а также обладают корректирующим действием на синтетическую функцию щитовидной железы и показатели углеводного обмена (Cho, H.R. et al., 2003, Ефимов, С. Н. и др., 2004, Замощина, Т.А. и др., 2011, Кононенко, А. Г. и др., 2016, Al-Snafi, A. E., 2019)

Информация о составе и содержании БАС разных видов рясковых, по отдельным представителям и группам, носит фрагментарный характер, а для некоторых представителей подсемейства отсутствует. Наиболее изученным является состав amino- и жирных кислот и общее содержание белка у отдельных видов рода *Lemna* (*Lemna minor*, *Lemna trisulca*) и рода *Spirodella* (*Spirodella polyrrhiza*).

При этом сведения о морфолого-анатомическом строении указанных объектов отсутствуют в литературе.

Цель исследования. Сравнительное фармакогностическое изучение травы *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*Lemna polyrrhiza* L.) и разработка нормативной документации на новый вид растительного лекарственного сырья с иммуноотропной активностью.

Задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели:

1. На основании анализа литературных данных обосновать выбор репрезентативных объектов и дизайн их исследования.
2. Исследовать химический состав *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.).
3. Изучить влияние БАС *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.) на функциональную активность клеток иммунной системы.
4. Провести сравнительное морфолого-анатомическое исследование *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.).

5. Разработать параметры качества и проект фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье «Ряски трава».

Научная новизна.

Впервые проведен сравнительный общий фитохимический анализ трех видов рясок. Установлено, что все исследуемые виды в большей степени накапливают фенольные соединения (кумарины, гидроксibenзойные и гидроксикоричные кислоты, флавоноиды и изофлавоноиды), аминокислоты (19, в том числе 8 незаменимых), и углеводы (преимущественно связанные сахара и водорастворимые полисахариды). Впервые методом ВЭЖХ определен компонентный состав полифенольного комплекса, методом ГХ-МС установлен мономерный состав, методом эксклюзионной ВЭЖХ проведен анализ молекулярно-массового распределения полисахаридов трех видов рясок.

Впервые проведено изучение влияния суммарных полифенольных комплексов и водорастворимых полисахаридов, выделенных из ряски малой (*L. minor*), ряски трёхдольной (*L. trisulca*), ряски многокоренной (*L. polyrrhyza*) на пролиферацию иммунокомпетентных клеток (спленоцитов), на NO-стимулирующую активность антигенпрезентирующих клеток (перитонеальных макрофагов), в том числе независимую от эндотоксина (с полимиксином), а так же влияние полисахаридов, выделенных из межвидовых смесей растений рода рясок, на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей. Установлено, что водорастворимые полисахариды рясок поляризуют антигенпрезентирующие клетки по классическому пути, усиливая Th-1 тип иммунного ответа.

В результате сравнительного изучения внешних и микроскопических признаков *L. minor*, *L. trisulca*, *L. polyrrhyza* установлены общие для всех видов признаки: наличие жилок, волосовидно-нитевидных корней, карманов, аэренхимы, рафид, друз и определены отличительные признаки для каждого вида, заключающиеся в особенностях окраски, формы и размеров листочков, количества корней, карманов, жилок и их расположения, формы и степени извилистости клеток эпидермиса, степени развития аэренхимы, наличия (отсутствия) устьиц и пигментов.

Практическая значимость. Сравнительное комплексное морфолого-анатомическое, химическое и биологическое исследование трёх видов рясок расширило сведения о распространенных в Сибири представителях таксона Рясковые семейства Ароидные. Полученные экспериментальные данные позволили обосновать использование травы трёх видов рясок подсемейства *Lemnaceae* в качестве сырьевого источника водорастворимых полисахаридов с иммуностропной активностью. На основании проведенного исследования разработан проект фармакопейной статьи «Ряски трава». Для целей стандартизации обоснован выбор методик количественного определения целевых групп БАВ в сырье: полисахаридов и фенолоксилов.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы базируется на изучении и систематизации литературных данных в области фармакогностического и химико-фармакологического исследования видов

подсемейства *Lemnaceae*, выбора репрезентативных объектов, постановка цели и определение дизайна исследования. Объектами исследования служили три вида растений семейства *Lemnaceae* (*Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L., *Spirodella polyrrhiza* Schleid, син. *Lemna polyrrhiza* L.), собранные в естественных местах обитания. Морфолого-анатомические исследования проводили с использованием световой микроскопии, цифровой фотографии и гистохимических реакций. Для анализа химического состава БАВ в исследуемых объектах использовали различные качественные реакции, спектральные, хроматографические и другие общепринятые методы анализа. Исследование биологической активности проводили на моделях *in vivo* и *in vitro* согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов, А. Н., 2012) и стандартным методикам. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с Государственной фармакопеей 14 издания (Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2018). Для расчета использовали программы Statistica 6.0, Microsoft Office Excel, критерии Стьюдента, Манна-Уитни. При проявлении эффекта с уровнем значимости $p < 0,05$ результаты эксперимента считали достоверными.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность диссертационной работы подтверждена экспериментальными данными, полученными с использованием световой микроскопии, цифровой фотографии, гистохимических и качественных реакций, спектральных, хроматографических и других общепринятых фармакогностических, аналитических и биологических методов исследования, что иллюстрируется соответствующим количеством фотографий, хроматограмм, спектров, таблиц, схем и рисунков. Все методики количественного определения валидированы, полученные данные подвергнуты статистической обработке в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи 14 издания. Для расчета использованы программы Statistica 6.0, Microsoft Office Excel, критерии Стьюдента, Манна-Уитни.

Основные положения и результаты работы представлены и обсуждены на Первой Всероссийской молодежной научной конференции, посвященной 125-летию биологических исследований в Томском государственном университете (Россия, Томск, 2010); восьмой международной научно-практической конференции «Scientific Research in XXI Century» (Canada, Ottawa, 2021); восьмой международной научно-практической конференции «Challenges in science of nowadays» (USA, Washington, 2021).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты исследования химического состава *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.).
2. Результаты изучения влияния БАВ *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.) на функциональную активность клеток иммунной системы.
3. Результаты морфолого-анатомического исследования *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.).

4. Результаты разработки параметров качества лекарственного растительного сырья и проект фармакопейной статьи «Ряска трава».

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует научной специальности – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки). Области исследований - «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе»;

«Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»;

«Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»;

Публикации материалов исследования. По результатам диссертационной работы опубликовано 12 работ, в том числе: 8 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, из них 6 работ, входящих в базы цитирования SCOPUS и WoS и 3 тезиса докладов на международных и всероссийских конференциях.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 162 страницах машинописного текста, содержит 21 таблицы и 48 рисунков; состоит из введения, пяти глав, выводов и заключения, списка использованных литературных источников, включающего 143 работы, 89 из них на иностранном языке, 3 приложений.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект и методы исследования

Объектами исследования служила трава трех видов растений семейства *Lemnaceae*, собранных в естественных местах обитания на территории Томской, Кемеровской и Новосибирской областей в 2011-2019 годах: ряска малая (*Lemna minor* L.), ряска тройчатая (*Lemna trisulca* L.), многокоренник обыкновенный (*Spirodella polyrrhiza* Schleid, син. ряска многокорневая – *Lemna polyrrhiza* L.) – далее по тексту: *LM*, *LT*, *SP*.

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

Внешние признаки листецов (травы) трех видов рясок изучали невооруженным глазом, с помощью ручной лупы и под стереоскопическим микроскопом МБС-10 (увеличения от 8x1 до 32x4) по методикам ОФС «Травы» ГФ XIV издания.

Приготовление и анализ микропрепаратов травы рясок проводили в соответствии с рекомендациями ОФС «Травы» и ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов» ГФ XIV издания.

Микропрепараты изучали под световым микроскопом «Axio Lab A1» (Carl Zeiss, Германия), фотографии получали с помощью цифрового фотоаппарата «Canon» 500 D и обрабатывали на компьютере в программе «Adobe Photoshop CS».

Для изучения химического состава и биологической активности использовали сухие экстракты, полученные методом дробной мацерации при нагревании на воде очищенной и 70% этаноле и фракции, полученные из них, с использованием в качестве экстрагентов хлороформа, этилацетата и н-бутанола.

Для анализа химического состава БАВ в исследуемых объектах использовали различные качественные реакции, спектральные, хроматографические и другие общепринятые методы анализа. ВЭЖХ выполняли на хроматографе (Shimadzu LC-20AD, Япония) с колонкой PerfectSil Target ODS-3 (MZ-Analysentechnik GMBH, Германия), а также на приборе Hewlett Packard Agilent 1100 Series с аналитической колонкой Zorbax SB-C₁₈ (Agilent Technologies, США). Обсчет данных ВЭЖХ производили с помощью программного обеспечения ChemStation. Качественный и количественный анализ аминокислот проводили при помощи аминокислотного анализатора Hitachi835 (Япония). Анализ свободных моносахаридов проводили методом прямофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Luna NH₂,6X (Phenomenex, США) с рефрактометрическим детектированием. Сбор и обработку данных осуществляли при помощи программы Экохром (ЗАО "Техлаб-М", Россия), отнесение пиков и расчет концентраций углеводов проводили по внешнему стандарту. Содержание связанных сахаров определяли методом капиллярного электрофореза, используя прибор Applied Biosystem 273T (ThermoFisher, LTD, США). Анализ полисахаридов проводили после их экстракции подкисленной водой и диализа в полупроницаемой мембране с диаметром пор 15 кДа (Cellu-Sep, США). Содержание углеводов определяли по методу Смита (Dubois, M. et al., 1956), урновых кислот по реакции с карбазолом после полного гидролиза (Корж, А. П. и др., 2011), содержание белка – методом Лоури (Lowry, O.H. et al., 1951) и нуклеиновых кислот по методу Спирина (Спирин, А.С. и др., 1958). Мономерный состав полисахаридов устанавливали методом ГХ на приборе Agilent 7890A (США) с колонкой HP-1MS с использованием триметилсилилированных стандартных образцов моносахаридов – Carbohydrates Kit (Sigma, США). Детектирование вели с помощью масс-спектрометра Agilent 5975S (США), метод ионизации - электронный удар (70 эВ). Анализ молекулярно-массового распределения проводили на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Dionex, Германия), колонка TSK GMPWXL (Tosoh Bioscience, Япония).

Острую токсичность сухого экстракта определяли в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н., 2012).

В фармакологических экспериментах использовали 70 мышей линии C57BL/6, в возрасте 8-10 недель (1 категории согласно сертификату), полученных из отдела экспериментальных биологических моделей структурного подразделения Томский НИЦ НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга.

Перитонеальные макрофаги получали прилипанием к пластику клеток перитонеального экссудата. Спленоциты получали гомогенизируя селезенки мышей в ледяном изотоническом растворе хлорида натрия (ФР), фильтруя через 4-слойный капрон, промывая холодным ФР. Полученные клетки ресуспендировали в культуральной среде и оценивали их жизнеспособность. В экспериментах использовали суспензии, содержащие не менее 95% жизнеспособных клеток.

Клетки культивировали при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и абсолютной влажности в среде следующего состава: RPMI 1640 (Sigma, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, Великобритания), 20 mM буферного раствора HEPES (Sigma, США), 0,05 mM 2-меркаптоэтанола (Sigma, США), 50 мкг/мл гентамицина (Sigma, США) и 2 mM L-глутамин (Sigma, США).

Влияние исследуемых веществ на функциональную активность клеток изучали следующим образом: полученные макрофаги (Мф) мышей культивировали в 96-луночных планшетах в присутствии полисахаридов и полифенолов растений в различных концентрациях; липополисахарида (ЛПС) E.coli (серотип O111:B4, Sigma, США) 1 мкг/мл; Кон А (Sigma, США) 4 мкг/мл; полимиксина В (InvivoGen, США) 10 мкг/мл.

Продукцию оксида азота (NO) макрофагами оценивали по содержанию нитритов в супернатантах при помощи реактива Грейса через 48 ч. Реактив смешивали с эквивалентным объемом надосадка, абсорбцию измеряли с использованием многоканального спектрофотометра Titertek Multiskan® MCC (Labsystems, Финляндия) при длине волны 540 нм. Концентрацию нитритов определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартных растворов нитрита натрия.

Для оценки пролиферации колориметрическим методом (Mosmann, T.R., 1983) за 4 ч до окончания культивирования спленоцитов в лунки с клетками вносили раствор МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид), (Sigma, США), в конечной концентрации 200 мкг/мл. Осадок растворяли диметилсульфоксидом (Sigma, США). Абсорбцию полученных растворов измеряли при помощи многоканального спектрофотометра при длине волны 540 нм.

Исследование полисахаридов на наличие примесей эндотоксина проводили при инкубации исследуемых образцов полисахаридов или ЛПС и полимиксина В (InvivoGen, США), с последующим определением концентрации нитритов в надосадке.

Активность аргиназы определяли с помощью тест-системы «Мочевина-450» (Био-ЛА-Тест, Чехия).

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование химического состава

L. minor L., *L. trisulca L.* и *Spirodella polyrrhiza Schleid (L. polyrrhiza L.)*

В результате общего фитохимического исследования доказано присутствие во всех объектах следующих групп БАВ: дубильных веществ, антраценпроизводных, флавоноидов, кумаринов, фенолкарбоновых кислот, аминокислот и полисахаридов. В траве *L. minor L. (LM)* обнаружены сапонины, которые отсутствуют в двух других видах.

Для дальнейшего исследования были получены экстракты растений на 70% этаноле, которые подвергли фракционированию с использованием растворителей возрастающей полярности (рисунок 1). Выходы экстрактов и фракций представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Технологические выходы экстрактов на 70%-м этаноле и его фракций.

Объект	Выход, % в пересчете на воздушно-сухое сырьё		
	<i>LM</i>	<i>LT</i>	<i>SP</i>
70% экстракт	4,7±0,4	3,3±0,3	6,4±0,3
ХФ	0,25±0,02	1,02±0,03	0,85±0,02
ЭАФ	0,11±0,01	0,18±0,01	0,19±0,01
БФ	0,27±0,02	0,39±0,02	0,38±0,02
ВО	4,02±0,02	1,71±0,02	4,96±0,02

Примечание: ХФ – хлороформная фракция; ЭАФ – этилацетатная фракция; БФ – бутанольная фракция; ВО – водный остаток.

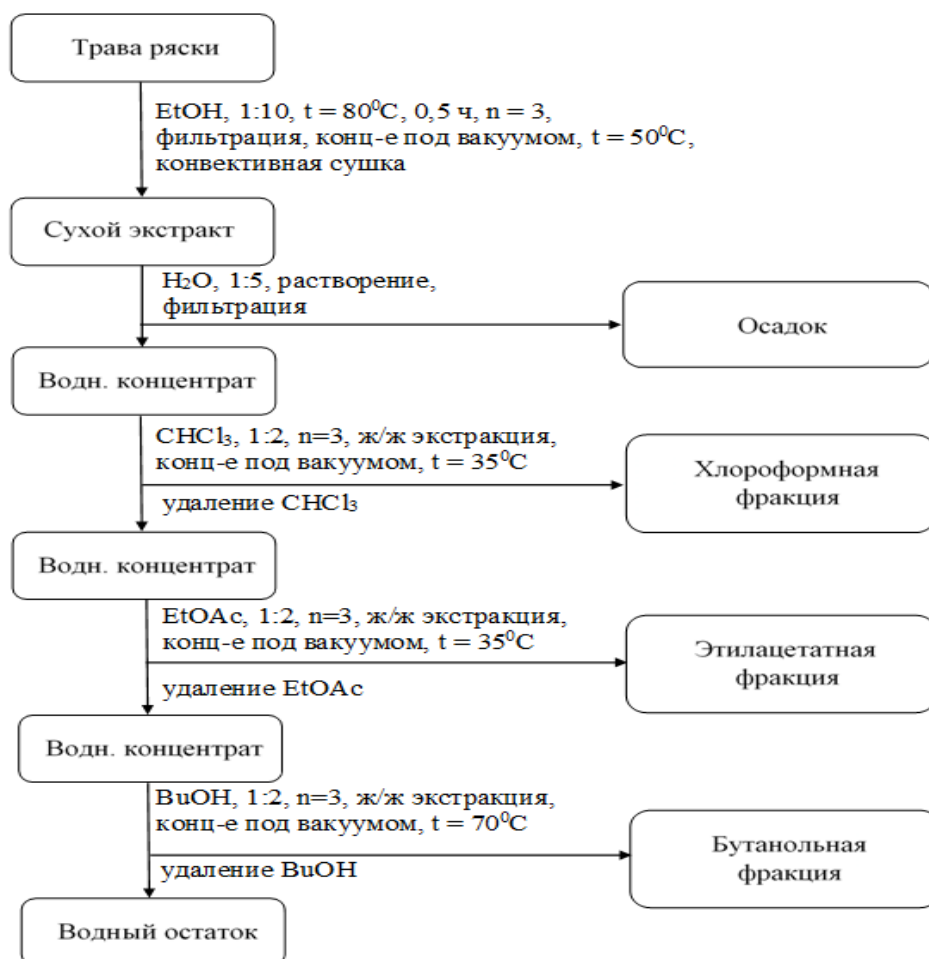


Рисунок 1 – Схема получения и фракционирования водно-спиртовых экстрактов.

Далее полученные экстракты и фракции подвергли ВЭЖХ-анализу. Установлено, что все исследуемые виды ряски в большей степени накапливают кумарины: мажорными компонентами *LM* являются хаплоперозид А и эскулин, *L. trisulca* L. (*LT*) – эскулин и эскулетин, *SP* – эскулин и фраксетин. Все виды характеризуются накоплением флавоноида мирицетина и изофлавоноида ононина.

Во всех трёх видах ряски в основном накапливаются *гидроксibenзойные* кислоты. Основным компонентом фенолкарбоновой природы является *2,5-дигидрокси-1,4-бензолдиуксусная кислота* с наибольшим содержанием в *LM*. *SP* отличается от двух других видов ряски содержанием ряда гидроксibenзойных кислот: *2,5-дигидроксибензойная* (отсутствует в *LM* и *LT*); *2,6-дигидроксибензойная* (*LM* – 0,17%; *LT* – 0,05%; *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*SP*) – 2,02%); *3,5-дигидроксикарбоновая кислота* (в 9,5 раз больше, чем других видах ряски). Для всех исследуемых видов рясок характерно накопление значительного количества таких гидроксикоричных кислот, как *хлорогеновая* (0,15-0,61%) и *кофейная* (0,03-0,26%). *SP* отличается от *LM* и *LT* накоплением *м-кумаровой кислоты* (*LM*, *LT* – следовые количества) и отсутствием *коричной*, *о-кумаровой* и *ванильной кислот*.

При изучении аминокислотного состава в исследуемых видах ряски было установлено наличие 19 аминокислот, в том числе 8 незаменимых. Среди заменимых

аминокислот преобладают аспарагиновая и глютаминовая кислоты, аргинин, аланин и глицин. Мажорными компонентами незаменимых аминокислот для всех видов являются лейцин, валин, лизин, фенилаланин, треонин и изолейцин. В траве *LT* содержится меньшее количество как заменимых, так и незаменимых аминокислот (59,7 мг на 1 г сырья) по сравнению с *LM* и *SP* (127,90 и 131,55 мг на 1 г сырья, соответственно).

Установлено, что исследуемые виды ряски содержат преимущественно связанные сахара: содержание связанных сахаров *LM* в 2 раза превышает количество свободных, *LT* и *SP* – в 14 и 7,5 раза соответственно (таблица 2).

Таблица 2 – Содержание связанных углеводов в рясках.

Вид ряски	Содержание, %			
	Пентозы		Гексозы	
	Арабиноза	Ксилоза	Галактоза	Глюкоза
<i>LM</i>	0,38±0,02	1,24±0,06	1,05±0,06	4,20±0,21
	Сумма			
	1,62		5,25	
<i>LT</i>	0,73±0,04	6,1±0,3	1,17±0,06	6,3±0,3
	Сумма			
	6,83		7,47	
<i>SP</i>	0,90±0,04	1,82±0,09	1,42±0,07	10,7±0,5
	Сумма			
	2,72		12,12	

Полученные данные и данные литературы о содержании в рясках отдельных групп БАВ и их биологической активности, послужили основанием для более детального исследования полисахаридного комплекса изучаемых видов. Выделенные полисахариды охарактеризовали по химическому составу. Данные по содержанию общих углеводов, белка, урсонических и нуклеиновых кислот в исследуемых ВРПС представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика образцов ВРПС *LM*, *LT* и *SP* (n=3).

ПС	Содержание в образце, %			
	углеводы	белок	нуклеиновые кислоты	урсонические кислоты
<i>LM</i>	96,9±1,8	0,14±0,03	0,0010±0,0001	41,77±0,03
<i>LT</i>	97,9±0,9	0,38±0,07	0,0043±0,0002	18,45±0,03
<i>SP</i>	98,4±2,0	0,27±0,06	0,0055±0,0004	30,28±0,03

Из данных ГХ-МС анализа следует, что полученные полисахариды отличаются по моносахаридному составу (таблица 4).

Таблица 4 – Моносахаридный состав полисахаридов *LM*, *LT* и *SP*.

Вид ряски	Содержание, %					
	<i>Glu</i>	<i>Gal</i>	<i>Xil</i>	<i>Ara</i>	<i>Man</i>	<i>Fru</i>
<i>LM</i>	35,07	10,56	12,60	-	-	-
<i>LT</i>	15,51	40,37	-	-	18,57	7,10
<i>SP</i>	41,33	10,43	-	12,88	-	5,08

ВЭЖХ фракций ВРПС показала присутствие трех пиков соединений с различными молекулярными массами, что свидетельствует о высокой степени полидисперсности (рисунок 2).

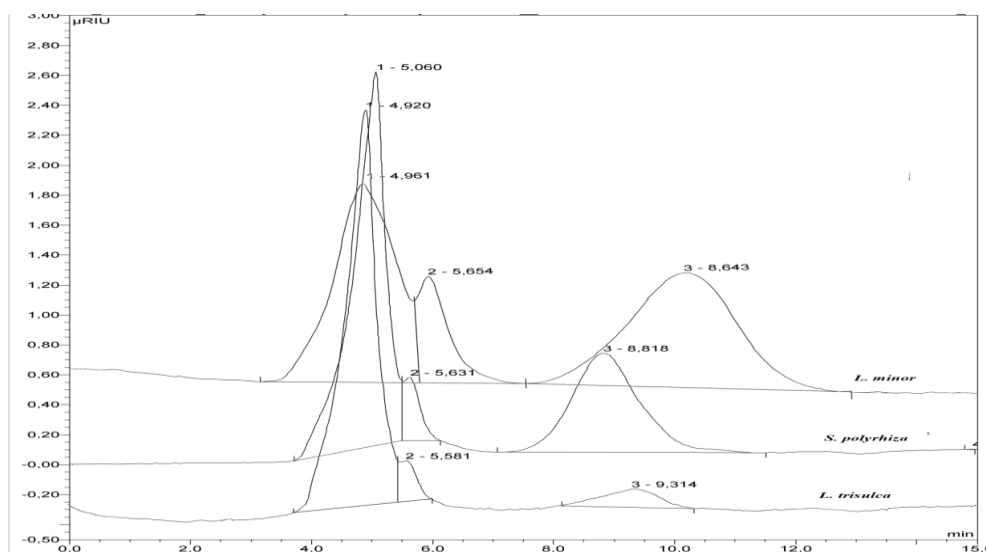


Рисунок 2 – Хроматограмма полисахаридных комплексов.

Таким образом, полисахариды, выделенные из растений рода *Lemna*, характеризуются низким содержанием примесей (белок и нуклеиновые кислоты) и высокой степенью полидисперсности. Изучаемые полисахариды значительно различаются по составу: так, в *LM* и *SP* преобладающими моносахаридами являются глюкоза и уроновые кислоты, при этом в *LM* обнаружена ксилоза, а в *SP* - арабиноза. В ПС, полученных из *LT* мажорным мономером является галактоза, а содержание глюкозы и уроновых кислот значительно ниже.

Имеющиеся в литературе сведения свидетельствуют о том, что фенольные соединения и полисахариды растений способны изменять основные функции макрофагов: усиливать фагоцитарную активность, продукцию активных форм кислорода и оксида азота (NO), который, в свою очередь, играет важную роль в регуляции функций различных систем организма, участвует в развитии адаптивных иммунных реакций, ингибирует репликацию патогенов, регламентирует апоптоз и пролиферацию клеток, включая макрофаги, Т-лимфоциты, тучные клетки, нейтрофилы и лимфоциты (Kraus, J. et al., 1992, Sun, H. et al., 2015, Yahfoufi, N., et al., 2018).

Эти сведения и данные о химическом составе рясок послужили основанием для дальнейшего этапа нашей работы - исследования иммуностропной активности полифенолов (ПФ) и полисахаридов (ПС) изучаемых видов.

2. Исследование биологической активности БАС *L. minor* L., *L. trisulca* L. и *Spirodella polyrrhiza* Schleid (*L. polyrrhiza* L.)

Исследуемые экстракты в дозах 2000, 5000 и 10000 мг/кг, не вызывали гибели экспериментальных животных на протяжении двух недель наблюдения после внутрижелудочного введения. Не наблюдали существенных изменений в поведении животных или появления патологических форм поведения. Это позволяет отнести исследуемые экстракты к малотоксичным веществам по классификации Ходжа и Стернера. Согласно существующей классификации (ГОСТ 12.1.007 – 76), исследуемые экстракты соответствуют IV классу «Вещества малоопасные».

Для определения оптимальных рабочих концентраций и оценки возможного токсического действия изучаемых веществ на клетки системы иммунитета было изучено влияние полифенолов (ПФ) и полисахаридов (ПС) из *LM*, *LT* и *SP* на пролиферацию спленоцитов интактных мышей линии *C57/BL6 in vitro*. В качестве контроля использовали спленоциты, инкубированные со средой (контроль 1) и спленоциты, культивированные с конканавалином А (Кон А) (контроль 2).

В результате проведенных исследований было обнаружено, что ПС, выделенные из вышеперечисленных растений, не оказывали токсического действия на спленоциты и не снижали уровень пролиферации по сравнению с интактным контролем 1 (таблица 5).

Таблица 5 – Влияние различных концентраций полифенолов и водорастворимых полисахаридов рясок на пролиферацию спленоцитов интактных мышей линии *C57/BL6* ($X \pm m$).

Исследуемое вещество	Концентрация, мкг/мл	Пролиферация, у.е. оптической плотности
Среда (контроль 1)	-	155±14
Кон А (контроль 2)	4	266±15*
ПС <i>LM</i>	5	147±7 [▲]
	20	185±15 [▲]
	80	199±19 [▲]
ПС <i>LT</i>	5	214±8* [▲]
	20	233±16*
	80	289±15*
ПС <i>SP</i>	5	186±5* [▲]
	20	193±3* [▲]
	80	228±9*
ПФ <i>LM</i>	0,5	166±9 [▲]
	5	159±5 [▲]
	10	188±34 [▲]

	20	167±9 [▲]
	80	143±7 [▲]
	160	171±43 [▲]
ПФ <i>LT</i>	0,5	141±5 [▲]
	5	137±7 [▲]
	10	161±2 [▲]
	20	185±12 [▲]
	80	174±7 [▲]
	160	152±4 [▲]
ПФ <i>SP</i>	0,5	179±18 [▲]
	5	169±11 [▲]
	10	157±12 [▲]
	20	133±4 [▲]
	80	122±4 [▲]
	160	132±6 [▲]

Примечание: * – различия показателя с контролем 1 достоверны, $p < 0,05$; [▲] – различия показателя с контролем 2 достоверны, $p < 0,05$.

Уровень пролиферации при инкубации с ПС *LM* не отличался от интактного контроля, но был достоверно в 1,2 и 1,4 раза ниже митогенстимулированного уровня при применении концентраций 20 и 80 мкг/мл, соответственно. Добавление ПС *LT* и *SP* приводило к дозозависимому увеличению показателя относительно контроля 1. Более того культивирование с ПС *LT* в концентрациях 20 и 80 мкг/мл приводило к усилению пролиферации на уровне митогена, а при использовании ПС *SP* только в максимальной концентрации.

При инкубации спленоцитов с ПФ *LM*, ПФ *LT* и ПФ *SP* значения показателя были соизмеримы с интактным контролем, но достоверно ниже относительно стимуляции спленоцитов специфическим Т-клеточным митогеном Кон А (контроль 2): в 1,4-1,9 раза (ПФ *LM*), в 1,4-1,9 раз (ПФ *LT*), в 1,5-2,2 раза (ПФ *SP*) в зависимости от исследуемых концентраций.

Таким образом, ПС и ПФ не оказывают токсического действия на лимфоцитарное звено иммунной системы. ПС *LT* и ПС *SP* большой концентрации активируют пролиферацию спленоцитов.

В литературе имеются сведения о том, что полисахариды микроорганизмов, грибов и высших растений благодаря способности изменять функциональное состояние антиген-презентирующих клеток (макрофаги и дендритные клетки) обладают иммуномодулирующими свойствами (Vecchiarelli, A. et al., 2000, Chiapello, L.S. et al., 2003, Monari, C. et al., 2003, Stingele, F., et al., 2004). Известно, что различные полисахариды могут связываться практически со всеми рецепторами АПК (Schepetkin I. A. et al., 2006), поэтому дальнейшие исследования проводились на модели перитонеальных макрофагов.

В ходе проведённых экспериментов было выявлено (таблица б), что все изученные ПС вызвали усиление продукции оксида азота. Так, ПС *LM* вызвали увеличение концентрацию нитритов в 2,2 раза в концентрации 5 мкг/мл, в 1,9 раза –

20 мкг/мл и в 1,7 раза – 80 мкг/мл с $2,7 \pm 0,40$ мкМ в контроле до $6,1 \pm 0,33$, $5,0 \pm 0,18$ и $4,7 \pm 0,47$ мкМ соответственно. При инкубации с ПС *LT* концентрация NO увеличивалась в 5,8 раза (5 мкг/мл), в 6,5 раза (20 мкг/мл) и в 5,1 раза (80 мкг/мл). ПС *SP* усиливали продукцию оксида азота в 4,9 раза (5 мкг/мл), в 4,6 раза (20 мкг/мл) и в 3,5 раза (80 мкг/мл). Концентрация нитритов при культивировании с ЛПС увеличивалась в 8,7 раза с $2,7 \pm 0,40$ мкМ до $23,5 \pm 0,87$ мкМ, что значительно превышало значения показателя при активации ПС.

ПФ *LM* в концентрациях 5 и 20 мкг/мл не оказывали значительного влияния на продукцию оксида азота, а в концентрации 80 мкг/мл выявлено снижение продукции нитритов в 3,4 раза по сравнению с контролем 1 ($0,8 \pm 0,03$ мкМ от $2,7 \pm 0,40$ мкМ) и в 29,3 раз по сравнению с митогенстимулированным контролем 2 (от $23,5 \pm 0,87$ мкМ).

При инкубации Мф с ПФ *LT* в концентрации 5 мкг/мл продукция нитритов увеличивалась в 3,4 раза с $2,7 \pm 0,40$ мкМ до $9,2 \pm 0,24$ мкМ, но не изменялась в концентрациях 20 и 80 мкг/мл.

Таблица 6 – Влияние различных концентраций полифенолов и водорастворимых полисахаридов на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57/BL6 ($X \pm m$).

Исследуемое вещество	Концентрация (мкг/мл)	Концентрация нитритов (мкМ)
Среда (контроль 1)	-	$2,74 \pm 0,40$
ЛПС (контроль 2)	4	$23,49 \pm 0,87^*$
ПС <i>LM</i>	5	$6,10 \pm 0,33^{*\bullet}$
	20	$5,00 \pm 0,18^{*\bullet}$
	80	$4,69 \pm 0,47^{*\bullet}$
ПС <i>LT</i>	5	$15,81 \pm 1,07^{*\bullet}$
	20	$17,49 \pm 1,07^{*\bullet}$
	80	$13,93 \pm 0,52^{*\bullet}$
ПС <i>SP</i>	5	$13,13 \pm 1,02^{*\bullet}$
	20	$12,38 \pm 0,62^{*\bullet}$
	80	$9,39 \pm 0,8^{*\bullet}$
ПФ <i>LM</i>	5	$3,16 \pm 0,13^\bullet$
	20	$3,62 \pm 0,22^\bullet$
	80	$0,81 \pm 0,03^{*\bullet}$
ПФ <i>LT</i>	5	$9,17 \pm 0,24^{*\bullet}$
	20	$3,62 \pm 0,13^\bullet$
	80	$2,08 \pm 0,03^\bullet$
ПФ <i>SP</i>	5	$3,32 \pm 0,10^\bullet$
	20	$3,23 \pm 0,16^\bullet$
	80	$1,26 \pm 0,23^{*\bullet}$

Примечание: * – различия показателя с контролем 1 достоверны, $p < 0,05$;

• – различия показателя с контролем 2 достоверны, $p < 0,05$.

Культивирование Мф с ПФ *SP* в концентрации 5 и 20 мкг/мл не изменяли активность NO-синтазы, а в концентрации 80 мкг/мл снижали продукцию оксида азота в 2,1 раза по сравнению с контролем 1 (с $2,7 \pm 0,40$ до $1,3 \pm 0,23$ мкМ).

Таким образом, ПС *LM*, *LT*, *SP* в разной степени стимулируют продукцию оксида азота, а ПФ изучаемых растений в высоких концентрациях снижают концентрацию нитритов в культуре клеток.

Известно, что экстракты, выделенные из растений, могут содержать примесь эндотоксина (липополисахарида), который проявляет NO-стимулирующую активность (Schepetkin I.A. et al., 2006). Для того чтобы убедиться, что повышение продукции оксида азота перитонеальными макрофагами мышей в присутствии ПС и ПФ, выделенных из *LM*, *LT*, *SP* не связано с эндотоксином, были проведены эксперименты с использованием полимиксина В, связывающего ЛПС. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Влияние полимиксина В на стимулированную полисахаридами и полифенолами продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных мышей линии C57/BL6 ($\bar{X} \pm m$)

Исследуемое вещество	Конц-я, мкг/мл	Концентрация нитритов (мкМ)	
		без полимиксина В (контроль 2)	с полимиксином В
Среда (контроль 1)	-	$2,08 \pm 0,10$	$1,53 \pm 0,11$
ЛПС	1	$71,12 \pm 1,72^*$	$2,93 \pm 0,20^\bullet$
ПС <i>LM</i>	20	$26,65 \pm 0,31^*$	$43,97 \pm 0,23^* \bullet$
ПС <i>LT</i>	20	$52,76 \pm 0,17^*$	$57,73 \pm 0,71^* \bullet$
ПС <i>SP</i>	20	$41,74 \pm 1,38^*$	$51,38 \pm 0,36^* \bullet$
ПФ <i>LM</i>	5	$2,0 \pm 0,03$	$2,01 \pm 0,07$
ПФ <i>LT</i>	5	$9,79 \pm 0,38^*$	$2,81 \pm 0,12^* \bullet$
ПФ <i>SP</i>	5	$1,68 \pm 0,12$	$1,98 \pm 0,11$

Примечание: * – различия показателя с контролем 1 достоверны, $p < 0,05$;

• – различия показателя с контролем 2 достоверны, $p < 0,05$.

Полученные результаты доказывают отсутствие примесей эндотоксина в образцах всех ПС, выделенных из изучаемых растений. Усиление продукции оксида азота перитонеальными макрофагами, обусловлено непосредственно полисахаридными комплексами, выделенными из растений.

Снижение концентрации нитритов в культуре клеток с ПФ *LT* и полимиксином В свидетельствует о наличии примеси эндотоксина в составе изучаемого образца и выявленная активация является следствием этой примеси.

Заготовка сырья растений рода рясок осложнена трудоёмкой сортировкой его по видовому составу. Ботанический анализ показал, что в природе чаще всего встречается межвидовая смесь разных видов растений рода *Lemna* – *LM*, *LT* и *SP* в соотношениях 80:10:10 или 80:0:20, соответственно.

В связи с этим, нами была изучена способность ПС выделенных из межвидовых смесей стимулировать продукцию оксида азота (таблица 8).

Таблица 8 – Влияние ПС, выделенных из межвидовых смесей растений рода рясок, на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей, на продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами мышей линии C57/BL6 ($X \pm m$)

<i>Исследуемое вещество</i>	<i>Концентрация, мкг/мл</i>	<i>Концентрация нитритов, мкМ</i>
Среда (контроль 1)	–	2,16±0,09
ЛПС	1	34,53±0,32*
ПС LM	20	33,59±0,38*▲◆
ПС LT	20	39,06±0,79*■
ПС SP	20	42,70±0,57*●■
ПС LM:LT:SP (80:10:10)	20	33,20±0,37*▲◆
ПCLM:LT:SP (80:0:20)	20	33,23±0,23*▲◆
ПCLM:LT:SP (50:25:25)	20	36,97±0,85*

Примечание: * – различия показателя со средой достоверны, ● – различия показателя со средой с ЛПС достоверны, ■ – различия показателя по сравнению с ПС LM достоверны, ▲ – различия показателя с ПС LT достоверны, ◆ – различия показателя с ПС SP достоверны; $p < 0,05$.

Как видно из представленных данных, полисахариды, выделенные из межвидовых смесей растений рода рясок, не теряют своих NO-стимулирующих свойств.

3. Разработка критериев качества для стандартизации сырья.

3.1. Морфолого-анатомическое исследование.

Учитывая, что все три систематически близких вида часто образуют совместные заросли, а также вклад полисахаридного комплекса всех видов в иммуностропную активность, к заготовке и применению в медицинской практике предлагается растительное сырье с наименованием «Ряски трава», представляющее собой смесь *LM*, *LT* и *SP*.

К внешним признакам позволяющим идентифицировать и различить *LM*, *LT* и *SP* относятся: прозрачность, форма и край листочков; длина, количество и расположение карманов из которых развиваются дочерние растения; форма количество и цвет корней.

К дифференцирующим микроскопическим признакам относятся: извилистость клеточных стенок нижнего эпидермиса, размер клеток, наличие жилок, присутствие устьичного аппарата аномоцитного типа (*LM* и *SP*), отсутствие устьиц у *LT*. Также объем аэренхимы по отношению к площади листочков, наличие и диаметр межклетников, включения в виде друз и рафид. Клетки-идиобласты с пигментированным содержимым у *SP*. Прямостенные клетки эпидермиса корней (рисунки 3-6).

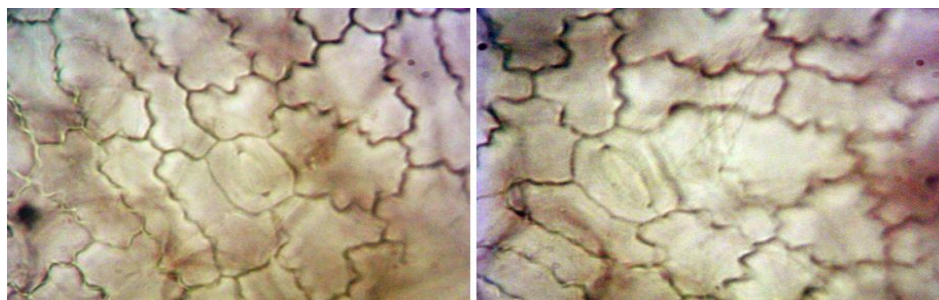


Рисунок 3 – Плоскостной препарат листеца *LM*:
Устьица аномоцитного типа на нижнем эпидермисе.

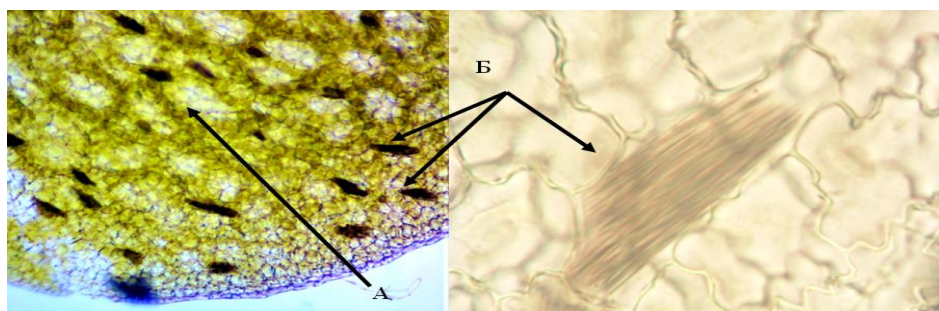


Рисунок 4 – Плоскостной препарат листеца *LM*:
А - аэренхима, Б – рафиды.

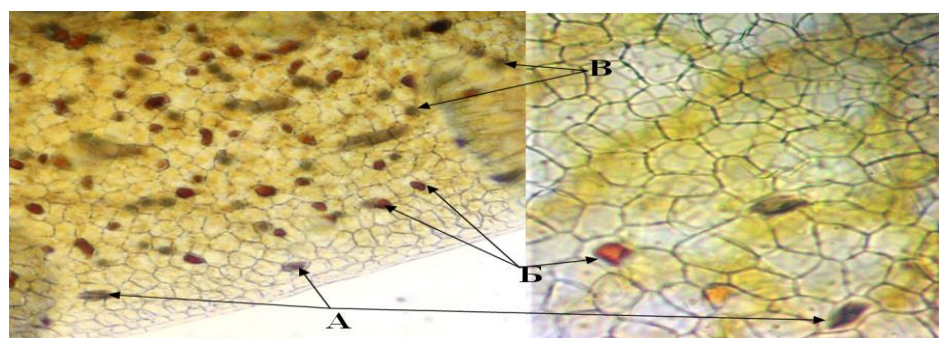


Рисунок 5 – Плоскостной препарат листеца *SP*:
А - рафиды, Б- клетки-идиобласты с пигментированным содержимым,
В – друзы.

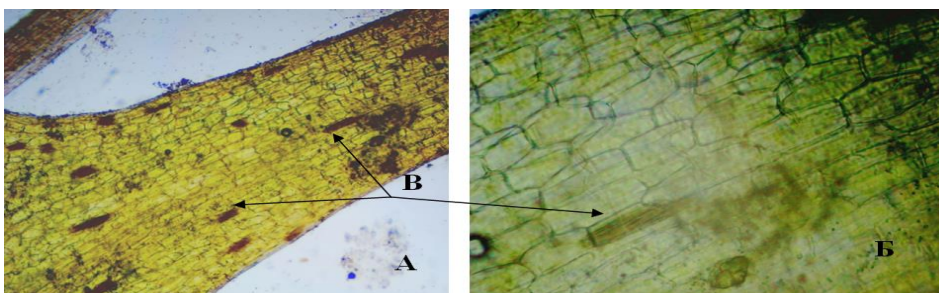


Рисунок 6– Плоскостной препарат листеца *LT*:
А – основание листеца и корень, Б - прямостенные клетки эпидермиса корня,
В – рафиды

Таким образом, на основании изучения внешних (макроскопических) и микроскопических (анатомических) особенностей были определены общие и отличительные диагностические признаки, позволяющие достоверно идентифицировать исследуемые виды.

3.2. Стандартизация сырья по показателю «Количественное определение»

Для определения содержания полисахаридов в сырье ряски была использована стандартная фармакопейная методика. Точную навеску сырья ряски помещали в колбу, заливали водой очищенной 1:20 и экстрагировали полисахариды на кипящей водяной бане течение 1 часа, затем извлечение фильтровали через тканевой фильтр и повторяли экстракцию ещё раз. Извлечения объединяли и фильтровали через бумажный фильтр под вакуумом. Фильтрат упаривали на ротормном испарителе до 1/5 исходного объема, после чего прибавляли 96 % этанол (1:3) и оставляли на 12 часов при температуре 8-10 °С для полного осаждения полисахаридного комплекса. Далее осадок отфильтровывали через бумажный фильтр (постоянная масса), промывали горячим 96 % этанолом, и ацетоном, затем высушивали до постоянной массы и взвешивали.

Поскольку гравиметрический метод количественного определения полисахаридов в растительном сырье является прямым методом измерения количества вещества, и ГФ РФ не требует подтверждения соответствия получаемых результатов с помощью подобных методик, поэтому валидацию не проводили.

Установлено, что преобладающей группой фенольных соединений в сырье ряски являются фенолкарбоновые кислоты, для количественного определения которых была выбрана распространенная методика прямой спектрофотометрии (Томашевская, О. Ю. и др., 2009), которую мы модифицировали в части пробоподготовки. Экспериментальным путем нами установлено, что при 30 и более минутах экстракции не наблюдается достоверного увеличения оптической плотности извлечения. Поэтому в методике количественного определения фенолкарбоновых кислот время экстракции – 30 минут. Ввиду наличия липофильных веществ в анализе, в методику подготовки проб внесена стадия жидкость-жидкостной экстракции гексаном в соотношении 1:5. С учетом полученного УФ-спектра извлечения из сырья ряски, в качестве стандарта предложено использовать хлорогеновую кислоту ($\lambda_{\text{max}} = 327 \text{ nm}$). Методику осуществляли следующим образом: точную навеску сырья (10,0) помещали в колбу, заливали 70 % этанолом (1:20) и экстрагировали на водяной бане в течение 30 минут с обратным холодильником при температуре 80 °С. Далее фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 250 мл, промывая трижды шрот на фильтре 70 % этанолом порциями по 5 мл. После чего доводили объем раствора в колбе до метки тем же растворителем. 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводили объем раствора до метки 70 % этанолом. 4 мл полученного раствора помещали в делительную воронку, добавляли 20 мл гексана, и интенсивно взбалтывали несколько раз. После расслоения отбирали 2 мл нижнего слоя в пробирку и удаляли растворитель в токе азота. Сухой остаток

растворяли в 2 мл 70 % этилового спирта и снимали УФ-спектр, параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца хлорогеновой кислоты. Таким образом, разработали рабочие условия методики количественного определения фенолкарбоновых кислот в сырье ряски.

Таблица 9 – Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения фенолкарбоновых кислот

Методика	Уровень содержания (%)	RSD (%) повторяемости	RSD (%) воспроизводимости	Правильность
Определение фенолкарбоновых кислот	80	2,70	2,26	99,83
	100	1,40	1,76	100,91
	120	1,10	1,03	98,47

Методика спектрофотометрического определения фенолкарбоновых кислот была валидирована по показателям: линейность, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность, правильность и является валидной (таблица 9).

Для обоснования значения показателей предельного содержания действующего вещества в сырье, с помощью предложенных методик проанализированы образцы ряски, заготовленные в различных областях произрастания. Так, в 7 образцах сырья из Западно-Сибирского региона установлен диапазон содержания: полисахаридов – 4,34-8,12 %, фенолкарбоновых кислот – 3,87-5,47 % (в пересчете на хлорогеновую кислоту).

Таким образом, определили нормативы качества сырья ряски по содержанию фенолкарбоновых кислот – должно быть не менее 3,5 % и полисахаридов – должно быть не менее 4,0 %.

ВЫВОДЫ

Проведенное сравнительное фармакогностическое исследование произрастающих на территории Сибири отдельных представителей подсемейства рясковые – ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного (*Spirodella polyrrhiza* Schleid (*Lemna polyrrhiza* L.)) и выделенных из них комплексов БАС позволило сформулировать следующие выводы:

1. Все исследуемые виды накапливают фенольные соединения: кумарины (мажорным компонентом *LM* являются хаплоперозид А и эскулин, *LM* – эскулин и эскулетин, *SP* – эскулин и фраксетин); флавоноиды (мирицетин) и изофлавоноиды (ононин); фенолкарбоновые кислоты (2,5-дигидрокси-1,4-бензолдиуксусная, 2,6-дигидроксибензойная, 3,5-дигидроксикарбоновая); гидроксикоричные кислоты (хлорогеновая – 0,15-0,61%, кофейная – 0,03-0,26%). *SP* отличается от *LM* и *LT* накоплением *m*-кумаровой кислоты и отсутствием коричной, *o*-кумаровой и ванильной кислот.

2. Во всех видах установлено наличие 19 аминокислот, в том числе 8 незаменимых. Среди заменимых аминокислот преобладают аспарагиновая и глютаминовая кислоты, аргинин, аланин и глицин. Мажорными компонентами незаменимых аминокислот для всех видов являются лейцин, валин, лизин, фенилаланин, треонин и изолейцин.

3. Все объекты содержат преимущественно связанные сахара: содержание связанных сахаров *LM* в 2 раза превышает количество свободных, *LT* и *SP* – в 14 и 7,5 раза соответственно. Полисахариды, выделенные из исследуемых растений, характеризуются низким содержанием органических примесей (белка и нуклеиновых кислот) и высокой степенью полидисперсности. Изученные полисахариды отличаются по мономерному составу, как нейтральных, так и кислых сахаров: в ПС *LM* и *SP* преобладающими моносахаридами являются глюкоза и уроновые кислоты, при этом в *LM* обнаружена ксилоза, а в *SP* – арабиноза; в ПС, полученных из *LT* мажорным мономером, является галактоза, а содержание глюкозы и уроновых кислот значительно ниже.

4. ПС и ПФ всех исследованных видов не оказывают токсического действия на иммунокомпетентные клетки мышей, а ПС в большой концентрации, напротив, активируют пролиферацию спленоцитов. ПС, выделенные как из отдельных видов, так и из межвидовых смесей этих растений эндотоксин-независимо стимулируют продукцию оксида азота перитонеальными макрофагами интактных животных. ПС, выделенные из *LM*, *LT*, *SP* поляризуют антигенпрезентирующие клетки по классическому пути, усиливая Th-1 тип иммунного ответа. ПС, выделенные из межвидовых смесей растений рода рясок в различных соотношениях, сохраняют иммуностропную активность на уровне ПС из отдельных видов рясок. Результаты сравнительного исследования иммуностропной активности БАВ *LM*, *LT*, *SP*, обосновывают возможность заготовки смешанных зарослей данных растений.

5. Общими макро- и микроскопическими признаками *LM*, *LT*, *SP* являются: наличие жилок, волосовидно-нитевидных корней, карманов, аэренхимы, рафид, друз. Установлены отличительные признаки для каждого вида, заключающиеся в особенностях окраски, формы и размеров листочков, количества корней, карманов, жилок и их расположения, формы и степени извилистости клеток эпидермиса, степени развития аэренхимы, наличия (отсутствия) устьиц и пигментов.

6. Разработаны параметры качества и проект ФС на лекарственное растительное сырье «Ряски трава». Предложены методики количественного определения полисахаридов и фенолокислот в сырье. Методика спектрофотометрического определения фенолокислот валидирована по показателям: линейность, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность и правильность. Установлен диапазон содержания в сырье для полисахаридов (4,34-8,12 %) и фенолокислот (3,87-5,47 %). Определены нормы качества для стандартизации и разработки проекта ФС на сырье.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Результаты диссертационного исследования имеют научно-прикладное значение для фармацевтической химии и фармакогнозии, в частности для дальнейшей разработки активных фармацевтических субстанций на основе полифенолов и водорастворимых полисахаридов представителей подсемейства рясковые, обладающих иммуностропной активностью.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Келус, Н. В. Адсорбционная активность сырья водно-болотных растений Западной Сибири / Н. В. Келус, Л. Г. Бабешина, С. Е. Дмитрук, **Л. Н. Никифоров** // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2009. – №4. – С.37–41.

2. Субботина, Н.С. Исследование исходного сырья и экстрактов на содержание тяжелых металлов / Н.С. Субботина, С. Е. Дмитрук, Л. Г. Бабешина, Н. В. Келус, **Л. А. Никифоров**, Г. Н. Носкова, М. И. Тартынова // **Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина.** – 2010. –Т. 8. –№ 3. – С. 92–97.

3. Замощина, Т.А. Биологическая активность спиртовых извлечений из ряски малой (*Lemna minor* L.) в отношении процесса воспаления / Т. А. Замощина, **Л. Н. Никифоров**, Е. Ю. Просекина, Т. А. Томова // **Вестник Томского государственного университета. Биология.** – 2011. – №2. – С. 73–80.

4. **Никифоров, Л. А.** Изучение аминокислотного состава ряски малой (*Lemna minor* L.) / Л. А. Никифоров, М. В. Белоусов, Н. С. Фурса // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2011. – Т. 10. – № 5. – С. 74–77.

5. Адекенов, С. М. Фенольные соединения бутанольных извлечений *Lemna minor* L., *Lemna trisulca* L. и *Lemna polyrrhiza* L. Schleid. и их иммуномодулирующая активность / С. М. Адекенов, М. Г. Данилец, С.А. Ивасенко, **Л. А. Никифоров**, С. В. Кривошеков, А. А. Лигачева, Е.С. Трофимова, Е. Ю. Шерстобоев, В. В. Жданов, М. В. Белоусов // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2017. – №3. – С. 5–15.

6. **Никифоров, Л. А.** Сравнительное исследование веществ первичного обмена ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски тройчатой (*Lemna trisulca* L.) и многокоренника обыкновенного (*Spirodella polyrrhiza* L. Schleid.) / Л. А. Никифоров, Н. С. Фурса, С. В. Кривошеков, В. А. Куркин, М. В. Белоусов // **Бюллетень сибирской медицины.** – 2017. – Т. 16. – №1. – С. 59–64.

7. **Никифоров, Л. А.** Сравнительная химическая характеристика водорастворимых полисахаридов ряски малой (*Lemna minor* L.), ряски трёхдольной (*Lemna trisulca* L.) и ряски многокоренной (*Lemna polyrrhiza* L.) и их влияние на функциональную активность клеток иммунной системы / Л. А. Никифоров, С. В. Кривошеков, А. А. Лигачёва, К. И. Ровкина, Е. С. Трофимова, В. Мамедова, М. В. Белоусов // **Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.** – 2020. – № 3. – С. 63–71.

8. **Никифоров, Л.А.** Разработка параметров стандартизации сырья ряски малой (*Lemna minor* L.) / Л. А. Никифоров, С. В. Кривошеков, Н. Э. Коломиец, Т. В.

Кадырова, Н. В. Исайкина, Н. Ю. Абрамец, Е. А. Безверхняя, М. В. Белоусов // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2021. – Т. 10. – № 1. – С. 74–81.

9. Никифоров, Л. А. Изучение биоэлементного состава *Lemna minor* и *Lemna trisulca* / Л. А. Никифоров, С. Е. Дмитрук // Микроэлементы в медицине. – 2008. – Т. 9. – № 1-2. – С. 23–24.

10. Никифоров Л. А. Особенности морфолого-анатомического строения некоторых представителей семейства *Lemnaceae* S.F. Gray / Л. А. Никифоров, Л. Г. Бабешина // Труды Томского государственного университета: Материалы Первой Всероссийской молодежной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты современной биологии», посвященной 125-летию биологических исследований в Томском государственном университете. Россия, Томск. – 2010. – Т. 275. – С. 57–60.

11. Никифоров, Л. А. Виды подсемейства рясковые-перспективный источник лекарственных препаратов / Л. А. Никифоров // Scientific Collection «InterConf» with the Proceedings of the 8th International Scientific and Practical Conference «Scientific Research in XXI Century». Canada, Ottawa. –2021. – № 44. – С. 548–550.

12. Никифоров, Л. А. Биологически активные вещества видов подсемейства рясковые / Л. А. Никифоров // Scientific Collection «InterConf» with the Proceedings of the 8th International Scientific and Practical Conference «Challenges in science of nowadays». USA, Washington. –2021. – № 48. – С. 797–799.