

УДК 543.062:547.586.5:615.322:633.884

ПЛОДЫ РЯБИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*SORBUS AUCUPARIA L.*) КАК ИСТОЧНИК СРЕДСТВА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

© Н.В. Исайкина^{1*}, Г.И. Калинин¹, Т.Г. Разина², Е.П. Зуева², О.Ю. Рыбалкина^{2,3}, А.В. Ульрих²,
Е.П. Фёдорова², А.Б. Шилова¹

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Московский тракт, 2, Томск, 634050 (Россия), e-mail: nadezhda.isaykina@gmail.com

² Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга, пр. Ленина, 3, Томск, 634028 (Россия)

³ Национальный исследовательский Томский государственный университет, пр. Ленина, 36, Томск, 634050 (Россия)

Исследован состав фенольных соединений экстрактов плодов рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia L.*), приготовленных на 40% этаноле и 95% подкисленном этаноле. Установлены различия в содержании флавоноидов, в том числе антоцианов, и фенолокислот. Выявлено, что наиболее эффективно повышает противометастатическую активность циклофосфана экстракт плодов рябины обыкновенной на 95% подкисленном этаноле, обогащенный антоцианами. Цель исследования – изучить влияние водно-спиртовых экстрактов плодов рябины обыкновенной на развитие карциномы легких Льюис и противоопухолевую активность циклофосфана; выявить наиболее эффективный экстракт, содержащий фенольный комплекс, для дальнейшего изучения в качестве перспективного лекарственного средства.

Ключевые слова: экстракты плодов рябины обыкновенной, фенольные соединения, карцинома легких Льюис, антоцианы, антиметастатическая активность.

Введение

Исайкина Надежда Валентиновна – доцент кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, e-mail: nadezhda.isaykina@gmail.com

Калинкина Галина Ильинична – заведующая кафедрой фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, e-mail: galina_kalinkina@mail.ru

Разина Татьяна Георгиевна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории онкофармакологии, e-mail: razinatg22@gmail.com

Зуева Елена Петровна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией онкофармакологии, e-mail: zep0929@mail.ru

Рыбалкина Ольга Юрьевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории онкофармакологии, e-mail: olgatomsk87@gmail.com

Ульрих Алина Валерьевна – лаборант-исследователь лаборатории онкофармакологии, e-mail: galiulina_1992@mail.ru

Фёдорова Елена Павловна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отдела лекарственной токсикологии, e-mail: fedorova-elen@mail.ru

Шилова Анна Борисовна – интерн, e-mail: nyutkashilova17@inbox.ru

На сегодняшний день онкологические заболевания остаются одними из основных причин смертности населения во всем мире. Современная онкологическая клиника обладает постоянно расширяющимся арсеналом химиотерапевтических препаратов, которые используются с целью эрадикации опухолевой ткани или максимально возможного уменьшения опухолевой массы, уничтожения метастатических узлов, достижения длительной ремиссии и увеличения выживаемости больных. Однако все цитостатические препараты, наряду с опухолевыми, повреждают и здоровые быстро пролиферирующие клетки организма – волосяные фолликулы, эпителий ЖКТ, костный мозг, гонады и др. [1, 2]. Повысить эффективность химиотерапии либо снизить ее токсичность возможно при включении в схему лечения препаратов-корректоров природного происхождения. Механизмы фармакотерапевтиче-

* Автор, с которым следует вести переписку.

ского действия растительных препаратов объясняются действием входящих в их состав биологически активных веществ. Наибольший интерес представляют флавоноидсодержащие растения в связи с тем, что содержащиеся в них флавоноиды, в том числе антоцианы, проявляют антиоксидантную активность, связывая свободные радикалы, уменьшают их концентрацию в клеточных мембранах, защищая молекулы ДНК от повреждающего влияния интермедиантов и перекисления. Кроме того, антоцианы способны стимулировать дифференцировку опухолевых клеток [3]. Растения, содержащие флавоноиды, обладают мочегонным и гепатопротекторным действием, что способствует обезвреживанию и удалению токсинов и шлаков, в большом количестве накапливающихся при раковых заболеваниях [4].

В связи с вышесказанным представилось целесообразным изучить в онкологическом эксперименте водно-спиртовые экстракты плодов рябины обыкновенной. Ранее было установлено, что экстракт плодов рябины обыкновенной, полученный по рациональной технологии 95% подкисленным этанолом, обладает выраженным противовоспалительным и иммуностропным действием [5].

Рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia L.*) – дикорастущее или культивируемое дерево или кустарник семейства розоцветных (*Rosaceae*). Плоды рябины обыкновенной (*Fructus Sorbi aucupariae*) являются официальным лекарственным растительным сырьем и входят в состав витаминного сбора № 2 в качестве поливитаминного средства [6]. Плоды рябины содержат комплекс витаминов – С, В₂, Е, каротиноиды. Кроме того, в плодах содержатся фенольные соединения – флавоноиды, в том числе антоцианы, фенолоксилоны, дубильные вещества; полисахариды – пектиновые вещества и свободные сахара; цианогенные соединения; органические кислоты; микро- и макроэлементы [7]. По данным зарубежных исследователей плоды рябины обыкновенной, благодаря комплексу фенольных соединений, прежде всего, проантоцианидинов, обладают антиоксидантным, иммуностропным, противовоспалительным и капилляроукрепляющим действием [8, 9].

Цель настоящей работы – изучить влияние водно-спиртовых экстрактов плодов рябины обыкновенной на развитие карциномы легких Льюиса и противоопухолевую активность циклофосфана; выявить наиболее эффективный экстракт, содержащий фенольный комплекс, для дальнейшего изучения в качестве перспективного лекарственного средства.

Экспериментальная часть

Для получения водно-спиртовых экстрактов плоды рябины обыкновенной (*Sorbus aucuparia L.*, сем. *Rosaceae*) заготавливали в окрестностях г. Томска в период их полного созревания, сушили конвекторной сушкой при температуре 40–45 °С до воздушно-сухого состояния. Экстракты плодов рябины обыкновенной получали 40% этанолом и 96% подкисленным этанолом методом динамической дробной мацерации. Для получения экстрактов использовали лабораторный реактор с паровой рубашкой («Radleys», Германия) подключенный к погруженному циркуляционному блоку регулирования температуры «МО1» («Термэкс», Россия), верхнеприводной мешалке RZR 2020 («Heidolph», Германия) и шариковому холодильнику. Плоды рябины измельчали до размера частиц диаметром 0,3–0,5 см. Навеску плодов помещали в реактор, добавляли соответствующий этанол и экстрагировали при температуре 80 °С в течение 60 мин. Полученным извлечением экстрагировали новую порцию сырья. Готовые экстракты отстаивали при температуре не выше +10 °С не менее 2 суток до получения прозрачной жидкости, затем фильтровали и хранили при температуре не выше +5 °С, в защищенном от света месте. Сухой остаток жидких экстрактов плодов рябины обыкновенной определяли с помощью весового влагомера MS-70 («AND», Япония).

Анализ фенольных соединений плодов рябины и водно-спиртовых экстрактов проводили общепринятыми методами. Сумму фенольных соединений и дубильных веществ определяли перманганатометрическим методом с добавлением 1% раствора желатина для осаждения дубильных веществ [10, 11]. Количественное определение флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом с использованием комплексообразующей реакции с 5% спиртовым раствором алюминия хлорида [12]. Показания снимали на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 405 нм. Расчет суммы флавоноидов проводили с использованием удельного показателя поглощения рабочего стандартного образца (РСО) рутина, установленного нами экспериментально: 405,64. Определение фенолоксилонов и антоцианов в исследуемых экстрактах плодов проводили методом прямой спектрофотометрии. В качестве стандартных образцов использовали кислоту хлорогеновую (фенолоксилоны) и цианидин-3-О-глюкозид (антоцианы). Содержание фенолоксилонов определяли по удельному показателю поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) кислоты хлорогеновой, который при длине волны 327±2 нм составляет 507±2 нм [13]. Для расчета суммы антоцианов в экстрактах плодов рябины использо-

вали удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) известного вещества цианидин-3-О-глюкозида, который при длине волны 546 ± 2 нм составляет $100,0 \pm 2,0$ [14].

Качественный состав фенольных соединений изучали методами хроматографии на бумаге (БХ), в тонком слое сорбента (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Для ТСХ использовали пластинки Merck марки TLC Silicagel 60 F₂₅₄ (Германия) размером 20×20 см. Для хроматографирования флавоноидов использовали систему растворителей – *n*-бутанол : кислота уксусная ледяная : вода (4 : 1 : 2). На хроматограмме флавоноиды обнаруживали по характерному свечению в УФ-свете при длине волны 254, 365 нм и величине R_f до и после обработки хроматограмм 5% спиртовым раствором алюминия (III) хлорида. Для идентификации веществ использовали растворы РСО рутина, кверцетина, изокверцетина, апигенина, байкалина, скутеллярина, кемпферола, гиперозида, цинарозида, цианидин-3-О-глюкозид (Sigma-Aldrich, США).

Для хроматографирования фенолокислот методами ТСХ и БХ использовали системы – *n*-бутанол : кислота уксусная ледяная : вода (4 : 1 : 2), 2- и 15% растворы кислоты уксусной. Хроматограммы просматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм до и после обработки 5% этанольным раствором калия гидроксида. Идентификацию фенолокислот проводили сравнением с достоверными образцами галловой, феруловой, кофейной, *p*-кумаровой, ванилиновой, хлорогеновой, изохлорогеновой, коричной и салициловой кислот (Sigma-Aldrich, США).

Для уточнения различий в качественном составе экстрактов был использован метод ВЭЖХ. Анализ фенольных соединений методом ВЭЖХ проводили на хроматографе «Dionex Ultimate 3000», оснащенном УФ-детектором с диапазоном длин волн от 254 до 330 нм. Колонка из нержавеющей стали с обращенно-фазовым сорбентом Restek Pinnacle IC18 (150×4,6 мм, с размером частиц 5 мкм), скорость подвижной фазы – 1 мл/мин; температура колонки – комнатная, объем вводимой пробы – 20 мкл. Режим элюирования градиентный. Обработку полученных данных производили с использованием программного обеспечения Chromeleon и Microsoft Office 10.

Эксперименты выполнены на 116 конвенциональных мышах–самках линии C57BL/6 (массой 20-21 г в возрасте 3 мес.) 1-й категории (сертификат имеется), полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга (Томский НИМЦ). Содержание животных осуществляли по правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Эксперименты проведены в соответствии с приказом МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», Федеральным законом «О лекарственных средствах», «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Москва, 2005). Дизайн экспериментов одобрен Этическим комитетом НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга (Томский НИМЦ).

Карциному легких Льюис (LLC) перевивали внутримышечно по 5×10^6 клеток в 0,1 мл физиологического раствора [15]. Экстракты деалкоголизировали на водяной бане и водный остаток вводили мышам внутрижелудочно в дозах 1 и 5 мл/кг ежедневно с 7 суток после перевивки опухоли в течение 11 суток. В экспериментах применяли алкилирующий цитостатический препарат циклофосфан (ЦФ) производства ОАО «Биохимик» (Россия), который вводили мышам однократно внутрибрюшинно в дозе 125 мг/кг (на 11 сутки).

Показатели периферической крови мышей – общее число лейкоцитов (ОКЛ) и отдельных форменных элементов, общее количество эритроцитов, тромбоцитов, концентрацию гемоглобина, показатель гематокрита определяли на гематологическом анализаторе «Muclic 18 vet» (Cognau, Франция) на 3 сутки после введения цитостатика.

По окончании экспериментов (21 сутки) мышей выводили из эксперимента путем дислокации шейного отдела позвоночника, соблюдая «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденные МЗ РФ. Определяли массу первичной опухоли, подсчитывали количество и площадь метастазов в легких, вычисляли торможение роста опухоли (ТРО), частоту метастазирования и индекс ингибирования метастазирования (ИИМ) в процентах [15].

Обработку полученных результатов проводили с использованием непараметрических критериев Вилкоксона-Манна-Уитни (U) и углового преобразования Фишера (φ). Различия считали достоверными при $P < 0,05$ [16].

Результаты и обсуждение

Экстракт на 40% этаноле представляет собой тягучую жидкость темно-коричневого или бурого цвета со специфическим запахом и кисловато-горьким вкусом; экстракт на 95% подкисленном этаноле – темно-вишневую жидкость со специфическим фруктовым запахом кисловато-горького вкуса. Сухой остаток исследуемого экстракта на 40% этаноле составляет $28,5 \pm 0,15\%$, экстракта на 95% подкисленном этаноле – $14 \pm 0,22\%$. Существенная разница в содержании сухого остатка в исследуемых экстрактах объясняется тем, что 40% этанол извлекает из плодов рябины не только фенольные соединения, но и другие сопутствующие водорастворимые компоненты: белково-полисахаридный комплекс и минеральные вещества.

По данным химического анализа фенольные соединения плодов рябины обыкновенной и исследуемых экстрактов представлены флавоноидами, в том числе антоцианами, фенолокислотами и дубильными веществами (табл. 1).

Из таблицы следует, что исследуемые экстракты значительно отличаются по содержанию антоцианов. Ранее нами было показано влияние экстрагента на выход антоцианов из плодов рябины обыкновенной. Установлено, что фенольные соединения экстрактов плодов рябины представлены в основном антоцианами (цианидин-3-О-глюкозид) и проантоцианидинами (лейкоантоцианами), оптимальными условиями извлечения которых из сырья является 95% подкисленный этанол [14].

Предварительно состав фенольных соединений водно-спиртовых экстрактов рябины обыкновенной исследовали методом хроматографии на бумаге (БХ) и в тонком слое сорбента (ТСХ).

При просмотре хроматограмм (ТСХ) экстрактов на 40% этаноле и на 95% подкисленном этаноле в видимом свете обнаружено пятно красно-коричневого цвета с $R_f=0,39 \pm 0,01$ (цианидин-3-О-глюкозид). Просмотр хроматограмм в фильтрованном УФ-свете до и после обработки 5% этанольным раствором калия гидроксида и 5% этанольным раствором алюминия (III) хлорида показал наличие в экстракте на 40%-ном этаноле флавоноидов рутин, изокверцетина, апигенина, байкалина, скутеллярина, кемпферола; фенолокислот галловой, и хлорогеновой. В экстракте на 95% подкисленном этаноле обнаружены рутин, кверцетин, апигенин, байкалин, скутеллярин, кемпферол; фенолокислоты галловая и хлорогеновая.

При анализе фенолокислот методом хроматографии на бумаге (БХ) в исследуемых экстрактах дополнительно были обнаружены кофейная, феруловая, *n*-кумаровая и ванилиновая кислоты.

С помощью ВЭЖХ в исследуемых экстрактах подтверждено присутствие рутина, кверцетина, изокверцетина, апигенина, байкалина, кемпферола, скутеллярина, хлорогеновой, феруловой, коричной и салициловой кислот. Фенольные соединения экстрактов отличаются наличием в составе экстракта на 40% этаноле изокверцетина, а в составе экстракта на 95% подкисленном этаноле – кверцетина, а также коричной и салициловой кислот (табл. 2).

В экспериментах на мышцах с карциномой легких Льюис (1 и 2 серия) применение циклофосфана привело к достоверному уменьшению массы первичной опухоли (в 1,2 и 1,6 раза), уменьшению количества и площади метастазов в легких (в 2,8 и 3,3; 7,8 и 21,0 раза соответственно) (табл. 3).

В случае изолированного назначения мышам с карциномой легких Льюис экстракта на 40% этаноле достоверного влияния на развитие опухолевого процесса не выявлено. В то же время если животные получали экстракт на 95% подкисленном этаноле, обнаружено достоверное ингибирующее влияние как на первичную опухоль (ТРО = 12 и 20% при использовании в дозах 1 и 5 мл/кг соответственно), так и метастазы (1 мл/кг) – их количество и площадь уменьшились в 1,8 и 3,4 раза по сравнению с данными контроля (табл. 1). Таким образом, ингибирующее влияние на развитие опухоли проявил экстракт на 95% подкисленном этаноле, что, вероятно, обусловлено более высоким содержанием антоцианов и согласуется с данными литературы: установлено, что антоцианы ингибируют развитие канцерогенеза и подавляют пролиферацию опухолевых клеток [17–22].

Добавление в схему химиотерапии исследуемых экстрактов плодов рябины обыкновенной не меняло эффективность лечения в отношении первичной опухоли (табл. 3). В то же время выявлено усиление противометастатического действия цитостатика под влиянием экстрактов плодов рябины, более выраженное при использовании экстракта на 95% подкисленном этаноле. Так, у мышей, получавших совместно с циклофосфаном экстракт на 40% этаноле в дозах 1 и 5 мл/кг, количество метастазов снизилось в 1,8 и 2,0 раза ($P < 0,01$), их площадь оказалась в 2,9 и 2,7 раза меньше ($P < 0,05$) этих показателей у животных группы монокимиотерапии; индекс ингибирования метастазирования составил 78 и 83% (табл. 3).

Таблица 1. Содержание фенольных соединений в плодах и экстрактах плодов рябины обыкновенной

Объект исследования БАВ	Плоды рябины обыкновенной	Экстракт плодов рябины на 40% этаноле	Экстракт плодов рябины на 95% подкисленном этаноле
	% на а.с.м. сырья	% на сухой остаток экстракта	% на сухой остаток экстракта
Сумма фенольных соединений	2,97±0,15	6,9±0,35	7,3±0,37
Флавоноиды	0,06±0,01	0,17±0,01	0,11±0,01
Антоцианы	4,81±0,24	0,72±0,04	3,30±0,20
Фенолокислоты	0,99±0,05	2,59±0,13	2,97±0,15
Дубильные вещества	0,74±0,04	0,10±0,01	0,19±0,01

Таблица 2. Результаты ВЭЖХ анализа фенольных соединений экстрактов плодов рябины обыкновенной

Компонент	Время удерживания, мин		
	PCO	экстракт на 40% этаноле	экстракт на 95% подкисленном этаноле
Рутин	13,67	13,83	13,77
Кверцетин	21,61	–	21,61
Изокверцетин	14,37	14,51	–
Апигенин	24,58	24,58	24,59
Байкалин	19,79	19,68	19,62
Кемпферол	23,49	23,60	23,65
Скутелларин	18,83	18,80	18,77
Хлорогеновая кислота	9,06	9,06	9,06
Феруловая кислота	14,33	14,33	14,22
Коричная кислота	23,38	–	23,38
Салициловая кислота	20,03	–	20,02

Таблица 3. Влияние экстрактов плодов рябины обыкновенной на развитие карциномы легких Льюис и эффективность лечения циклофосфаном мышей линии C57BL/6

Группа, доза препарата x число введений (количество животных)	Масса опухоли (X±m), г	ТРО, %	Частота метастазирования, %	Количество метастазов на 1 мышшь (X±m)	Площадь метастазов на 1 мышшь (X±m), мм ²	ИИМ, %
1 серия (экстракт рябины на 40% этаноле)						
1. Контроль (10)	6,80±0,38 5,75±0,23	–	100	39,80±3,52	67,26±12,40	–
2. ЦФ 125 мг/кг × 1 (10)	1- 2P<0,05	15	100	14,40±1,63 1-2P<0,01	8,67±5,68 1-2P<0,01	64
3. Экстракт рябины 1 мл/кг × 12 (9)*	7,01±0,24	-3	100	36,11±2,78	59,20±8,47	9
4. Экстракт рябины 5 мл/кг × 12 (10)*	6,02±0,22	11	100	37,70±3,21	42,05±7,86	5
5. ЦФ + экстракт рябины 1 мл/кг (10)	5,68±0,35	16	100	8,08±3,06 2-5P<0,01	3,00±2,04 2-5P<0,05	78
6. ЦФ + экстракт рябины 5 мл/кг (10)	6,42±0,40	6	90	7,30±2,48 2-6P<0,01	3,23±1,99 2-6P<0,05	83
2 серия (экстракт рябины на 95% подкисленном этаноле)						
1. Контроль(9)	6,20±0,22 3,91±0,40	–	100	20,89±2,47	29,14±6,13	–
2. ЦФ 125 мг/кг × 1(10)	1- 2P<0,01	37	90	6,40±2,31 1-2P<0,01	1,39±0,80 1-2P<0,01	72
3. Экстракт рябины 1 мл/кг × 12 (10)**	5,46±0,24 1- 3P<0,05	12	100	11,70±1,22 1-3P<0,01	8,69±1,08 1-3P<0,01	44
4. Экстракт рябины 5 мл/кг × 12 (10)**	4,95±0,20 1- 4P<0,01	20	100	18,10±3,95	24,85±11,62	13
5. ЦФ + экстракт рябины 1 мл/кг (10)	3,42±0,46	45	20 2-5P<0,01	0,60±0,43 2-5P<0,01	0,04±0,03 2-5P<0,01	99
6. ЦФ + экстракт рябины 5 мл/кг (8)	3,25±0,40	48	38 2-6P<0,01	0,38±0,18 2-6P<0,01	0,12±0,01 2-6P<0,01	99

Примечания. В таблицах 3 и 4: – перед уровнем значимости P указаны номера сравниваемых групп; *контроль – животные с опухолью без лечения; *содержание антоцианов в 1 мл экстракта рябины на 40% этаноле в расчете на сухой остаток составляет 7,2 мг; в 5 мл экстракта – 36 мг; **содержание антоцианов в 1 мл экстракта рябины на 96% подкисленном этаноле в расчете на сухой остаток составляет 33 мг; в 5 мл экстракта – 165 мг.

Если животным на фоне цитостатика вводили экстракт на 95% подкисленном этаноле в дозах 1 и 5 мл/кг, количество метастазов и их площадь оказались многократно меньше (в 1,8; 2,0 и 2,9; 2,7 раза соответственно), частота метастазирования составила 20 и 38% против 90% у животных группы монохимиотерапии; ИИМ оказался наивысшим, достигая 99% (табл. 3).

В повышении противометастатического действия цитостатика экстрактом рябины, вероятно, также имеет значение более высокое содержание антоцианов при использовании в качестве экстрагента 95% подкисленного этанола.

На 3 сутки после однократного введения циклофосфана в дозе 125 мг/кг общее количество лейкоцитов в периферической крови мышей уменьшилось в 2,9 и 3,8 раза ($P<0,01$) относительно контрольного уровня за счет снижения числа гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов в 3,2 и 4,6; 3,6; 3,4 и 5,0 раза соответственно ($P<0,01$) (табл. 4).

На этот срок наблюдения у животных, получавших совместно с циклофосфаном как тот, так и другой экстракты, в 1,3 раза ($P<0,05$) выше оказалось количество тромбоцитов относительно таковых у леченых только цитостатиком (табл. 4). При введении в схему химиотерапии экстракта на 40% этаноле в дозе 5 мл/кг в 4,2 раза ($P<0,05$) снизилось количество моноцитов в периферической крови мышей (табл. 4).

В случае изолированного использования экстракта на 40% этаноле в дозе 1 мл/кг в периферической крови достоверно меньше оказалось количество тромбоцитов (в 1,4 раза) относительно контроля (табл. 4). В то же время если животным вводили экстракт на 95% подкисленном этаноле в дозе 1 мл/кг, уровень гемоглобина оказался выше в 1,2 раза ($P<0,05$), а в случае использования в дозе 5 мл/кг достоверно повышенными оказались такие показатели, как количество моноцитов, тромбоцитов, эритроцитов, гематокрит и уровень гемоглобина (в 1,7; 1,5; 1,2; 1,2 и 1,3 раза соответственно) по сравнению с данными контроля. Таким образом, снижение гематотоксичности, судя по показателям красной крови и содержанию тромбоцитов в периферической крови, также проявляется при использовании экстракта на 95% подкисленном этаноле.

Таблица 4. Показатели периферической крови у мышей с карциномой легких Льюис, получавших экстракты плодов рябины обыкновенной на фоне циклофосфана ($X\pm m$)

Группа, доза препарата (число мышей)	ОКЛ, г/л	Гранулоциты, г/л	Лимфоциты, г/л	Моноциты, г/л	Тромбоциты, 10^9 /л	Эритроциты, 10^{12} /л	Гематокрит, %	Гемоглобин, г/л
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 серия (экстракт рябины на 40% этаноле)								
1. Контроль (6)	12,42± 0,87	1,03± 0,14	9,68± 0,65	1,72± 0,12	1002,33± 60,02	8,17± 0,32	28,52± 1,14	12,42± 0,50
2. ЦФ, 125 мг/кг (6)	4,30± 0,28	0,32± 0,08	2,72± 0,59	0,50± 0,11	864,00± 55,61	7,54± 0,52	26,40± 1,33	11,88± 0,66
3. Экстракт рябины 1 мл/кг (6)	14,37± 1,88	1,42± 0,39	10,67± 1,23	2,27± 0,34	700,50± 86,13	7,98± 0,63	28,47± 1,72	12,12± 0,87
4. Экстракт рябины 5 мл/кг (6)	12,53± 0,64	0,88± 0,15	9,83± 0,43	1,80± 0,13	913,33± 56,85	8,45± 0,27	29,48± 0,86	13,15± 0,44
5. ЦФ + экстракт рябины 1 мл/кг (6)	3,92± 0,28	0,25± 0,07	2,73± 0,57	0,42± 0,09	1151,67± 102,64	8,18± 0,43	28,08± 1,35	12,95± 0,62
6. ЦФ + экстракт рябины 5 мл/кг (6)	3,90± 0,49	0,37± 0,09	2,87± 0,71	0,12± 0,03	731,17± 112,71	7,20± 0,58	24,15± 1,74	12,25± 0,94
2 серия (экстракт рябины на 95% подкисленном этаноле)								
А. Фон (6)	12,75± 1,04	1,02± 0,12	11,05± 0,89	0,67± 0,06	1043,33± 53,03	12,11± 0,06	38,17± 0,22	18,55± 0,11

Окончание таблицы 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. Контроль (8)	11,41±	1,99±	8,69±	0,75±	539,63±	7,77±	26,06±	12,20±
	0,89	0,23 A-1P<	0,73	0,04	60,90 A-1P<	0,47	1,51 A-1P<	0,72 A-1P<
2. ЦФ 125 мг/кг (8)	3,01±	0,43±	2,44±	0,15±	623,50± 86,22	7,32±	23,30±	11,73±
	0,69	0,10	0,56	0,05		0,75	2,12	1,11
3. Экстракт рябины 1 мл/кг (6)	12,03±	1,98±	9,30±	0,77±	729,33±	9,08±	30,05±	14,33±
	1,54	0,15	1,42	0,03	74,85	0,22	0,79	0,38 1-3P<
4. Экстракт рябины 5 мл/кг (6)	16,03±	2,47±	12,25±	1,30±	793,17±	9,49±	31,93±	15,25±
	1,89	0,30	1,63	0,15 1-4P<	27,65 1-4P<	0,33 1-4P<	1,14 1-4P<	0,56 1-4P<
5. ЦФ + экстракт рябины 1 мл/кг (6)	2,32±	0,32±	1,87±	0,12±	576,50±	7,32±	24,17±	11,98±
	0,74	0,11	0,59	0,05	98,17	0,54	1,72	0,87
6. ЦФ + экстракт рябины 5 мл/кг (6)	1,77±	0,37±	1,12±	0,08±	787,00±	8,63±	27,07±	13,58±
	0,65	0,19	0,50	0,05	114,73 2-6P<			

Примечание. «Фон» – интактные животные без воздействия (здоровые).

Таким образом, обнаружено существенное повышение противометастатического действия циклофосфана экстрактами плодов рябины обыкновенной, судя по таким показателям процесса диссеминации, как количество и площадь метастазов в легких мышей с карциномой легких Льюис. Следует подчеркнуть, что наиболее эффективным оказалось применение в схеме химиотерапии экстракта на 95% подкисленном этаноле. При изолированном назначении животным экстракта на 40% этаноле ингибирующего влияния на развитие карциномы легких Льюис не отмечено, в то время как при использовании экстракта на 95% подкисленном этаноле проявилось достоверное торможение роста первичной опухоли и метастазов. В периферической крови мышей, получавших экстракт на 40% этаноле, количество тромбоцитов оказалось сниженным, а при использовании в схеме химиотерапии – уменьшилось и количество моноцитов. В противоположность этому, при использовании экстракта на 95% подкисленном этаноле у животных повышались показатели красной крови и количество моноцитов; уменьшалась также выраженность тромбоцитопении, вызванной введением циклофосфана.

Выводы

1. Установлено, что в составе фенольного комплекса экстракта плодов рябины обыкновенной на 40% этаноле содержание флавоноидов, фенолокислот, антоцианов составляет 0,17±0,01%; 2,59±0,13% и 0,72±0,04% соответственно; в экстракте на 95% подкисленном этаноле содержание флавоноидов, фенолокислот, антоцианов составляет 0,11±0,01%; 2,97±0,15%, 3,30±0,05% соответственно.

2. Выявлены различия в составе фенольного комплекса экстрактов плодов рябины обыкновенной – в экстракте на 40% этаноле идентифицированы флавоноиды: рутин, апигенин, байкалин, кемпферол, скутеллярин, изокверцетин, цианидин-3-О-глюкозид; фенолокислоты: хлорогеновая, *n*-кумаровая, ванилиновая, феруловая, кофейная, галловая; в экстракте на 95% подкисленном этаноле – рутин, апигенин, байкалин, кемпферол, скутеллярин, кверцетин, цианидин-3-О-глюкозид; хлорогеновая, *n*-кумаровая, ванилиновая, феруловая, кофейная, галловая, коричная и салициловая кислоты.

3. Наиболее эффективным в схеме химиотерапии опухолей циклофосфаном является экстракт плодов рябины обыкновенной на 95% подкисленном этаноле, обогащенный антоцианами. Целесообразно дальнейшее исследование экстракта плодов рябины обыкновенной, полученного на 95% подкисленном этаноле, в качестве средства для повышения эффективности химиотерапии опухолей.

Список литературы

1. Переводчикова Н.И. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. М., 2005. 704 с.
2. Чу Э., Де Вита-младший В. Химиотерапия злокачественных новообразований. М., 2009. 455 с.
3. Serafino A. Differentiation of human melanoma cells induced by cyaniding-3-O-beta-glucopyranoside // *FAS EB J.* 2004. Vol. 18. Pp. 1940–1942.
4. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer // *Pharmacol. Rev.* 2000. Vol. 52. Pp. 673–751.
5. Борсук О.С., Масная Н.В., Шерстобоев Е.Ю., Исайкина Н.В., Калинин Г.И. Влияние полифенольных соединений растительного происхождения на развитие иммунного ответа // *Вестник Уральской медицинской академической науки. Тематический выпуск по аллергологии и иммунологии.* 2011. Т. 35. №2/2. С. 9–10.
6. Государственный реестр лекарственных средств. Безопасность лекарственных препаратов [Электронный ресурс]. URL: www.grls.rosminzdrav.ru
7. Растительные ресурсы России: дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. Семейства Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae. СПб.; М., 2009. С. 243–245.
8. Olszewska M.A., Nowak S., Michel P., Banaszczak P., Kicel A. Assessment of the Content of Phenolics and Antioxidant Action of Inflorescences and Leaves of Selected Species from the Genus *Sorbus Sensu Stricto* // *Molecules.* 2010. N15. Pp. 8769–8783.
9. Olszewska M.A., Presler A., Michel P. Profiling of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Dry Extracts from the Selected *Sorbus* Species. // *Molecules.* 2012. N17. Pp. 3093–3113.
10. Федосеева Г.М. Способ определения фенольных соединений // *Тезисы докладов конференции изобретателей и рационалистов.* М., 1980. С. 84–85.
11. Федосеева Л.М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного, произрастающего на Алтае // *Химия растительного сырья.* 2005. №3. С. 45–50.
12. Государственная фармакопея Российской Федерации. М., 2015. Т. 3. 1294 с.
13. Коломиец Н.Э., Калинин Г.И., Сапронова Н.Н. Стандартизация листьев крапивы // *Фармация.* 2011. №6. С. 22–24.
14. Исайкина Н.В., Калинин Г.И., Андреева В.Ю., Шерстобоев Е.Ю., Масная Н.В., Шилова А.Б. Рябина обыкновенная: определение антоцианов в плодах // *Фармация.* 2015. №1. С. 19–21.
15. Софьина З.П., Сыркин А.Б., Голдин А., Кляйн А. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. М., 1980. 296 с.
16. Лакин Г.Ф. Биометрия. М., 1980. 293 с.
17. Seeram N.P. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro // *J. Agric Food Chem.* 2006. Vol. 54. N25. Pp. 9329–9339.
18. Bishayee A. et al. Anthocyanin-rich black currant extract suppresses the growth of human hepatocellular carcinoma cells // *Nat. Prod. Commun.* 2010. N5. Pp. 1613–1618.
19. Cai H. et al. Anthocyanin-rich red grape extract impedes adenoma development in the Apc (Min) mouse: pharmacodynamic changes and anthocyanin levels in the murine biophase // *Eur. J. Cancer.* 2010. Vol. 46. Pp. 811–817.
20. Hui C. et al. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo // *Nutr. Cancer.* 2010. Vol. 62. Pp. 1128–1136.
21. Adams L.S. Whole blueberry powder modulate the growth and metastases of MDA -MB-231 triple negative breast tumors in nude mice // *J. Nutr.* 2011. Vol. 141. Pp. 1805–1812.
22. Devi P.S., Kumar M.S., Das S.M. Evaluation of antiproliferative activity of red sorghum bran anthocyanin on a human breast cancer cell line (mcf-7) // *Int. J. Breast Cancer.* 2011. Art. No. 891481. 6 p.

Поступило в редакцию 21 февраля 2017 г.

После переработки 4 июля 2017 г.

Isaikina N.V.^{1*}, Kalinkina G.I.¹, Razina T.G.², Zueva E.P.², Rybalkina O.Yu.^{2,3}, Ulirich A.V.², Fedorova E.P.², Shilova A.B.¹ FRUITS OF *SORBUS AUCUPARIA L.* ARE SOURCE DRUG FOR INCREASE OF TUMORS EFFECTIVENESS CHEMOTHERAPY

¹ Siberian State Medical University, Moscovskii Trakt, 2, Tomsk, 634050 (Russia),
e-mail: nadezhda.isaikina@gmail.com

² Tomsk National Research Medical Center, Scientific Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg, pr. Lenina, 3, Tomsk, 634028 (Russia)

³ National Research Tomsk State University, pr. Lenina, 36, Tomsk, 634050 (Russia)

The composition of phenolic compounds of extracts of rowanberry (*Sorbus aucuparia L.*) fruit, prepared with 40% ethanol and 95% acidified ethanol was studied. Differences in the content of flavonoids, including anthocyanins, and phenolic acids have been established. It was found that the most efficiently increases the antimetastatic activity of cyclophosphamide extract of rowan fungi on 95% acidified ethanol enriched with anthocyanins. The purpose of the study was to: study the effect of hydroalcoholic extracts of rowan fungi on the development of Lewis lung carcinoma and the antitumor activity of cyclophosphamide; to reveal the most effective extract containing a phenolic complex, for further study as a promising drug.

Keywords: extracts of rowan fennel fruits, phenolic compounds, Lewis lung carcinoma, anthocyanins, antimetastatic activity.

References

1. Perevodchikova N.I. *Rukovodstvo po khimioterapii opukhlevykh zabolevaniy*. [Guide to chemotherapy for neoplastic diseases]. Moscow, 2005, 704 p. (in Russ.).
2. Chu E., De Vita-mladshii V. *Khimioterapiya zlokachestvennykh novoobrazovaniy*. [Chemotherapy of malignant neoplasms]. Moscow, 2009, 455 p. (in Russ.).
3. Serafino A. *FAS EB J.*, 2004, vol. 18, pp. 1940–1942.
4. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T.C. *Pharmacol. Rev.*, 2000, vol. 52, pp. 673–751.
5. Borsuk O.S., Masnaia N.V., Sherstoboev E.Iu., Isaikina N.V., Kalinkina G.I. *Vestnik Ural'skoi meditsinskoi akademicheskoi nauki. Tematicheskii vypusk po allergologii i immunologii*, 2011, vol. 35, no. 2/2, pp. 9–10. (in Russ.).
6. *Gosudarstvennyi reestr lekarstvennykh sredstv. Bezopasnost' lekarstvennykh preparatov* [State Register of Medicines. Safety of medicinal preparations]. [Elektronnyi resurs], URL: www.grls.rosminzdrav.ru (in Russ.).
7. *Rastitel'nye resursy Rossii: dikorastushchie tsvetkovye rasteniya, ikh komponentnyi sostav i biologicheskaya aktivnost'. T.2. Semeistva Actinidiaceae – Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae*. [Plant resources of Russia: wildflowering plants, their component composition and biological activity. Vol. 2. Families Actinidiaceae - Malvaceae, Euphorbiaceae – Haloragaceae]. St. Petersburg; Moscow, 2009, pp. 243–245. (in Russ.).
8. Olszewska M.A., Nowak S., Michel P., Banaszczak P., Kicel A. *Molecules*, 2010, no. 15, pp. 8769–8783.
9. Olszewska M.A., Presler A., Michel P. *Molecules*, 2012, no. 17, pp. 3093–3113.
10. Fedoseeva G.M. *Tezisy dokladov konferentsii izobretatelei i ratsionalistov*. [Abstracts of the Conference of Inventors and Rationalists]. Moscow, 1980, pp. 84–85. (in Russ.).
11. Fedoseeva L.M. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2005, no. 3, pp. 45–50. (in Russ.).
12. *Gosudarstvennaia farmakopeia Rossiiskoi federatsii*. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]. Moscow, 2015, vol. 3, 1294 p. (in Russ.).
13. Kolomiets N.E., Kalinkina G.I., Saponova N.N. *Farmatsiya*, 2011, no. 6, pp. 22–24. (in Russ.).
14. Isaikina N.V., Kalinkina G.I., Andreeva V.Iu., Sherstoboev E.Iu., Masnaia N.V., Shilova A.B. *Farmatsiya*, 2015, no. 1, pp. 19–21. (in Russ.).
15. Sofina Z.P., Syrkin A.B., Goldin A., Kliain A. *Eksperimental'naya otsenka protivopukhlevykh preparatov v SSSR i SShA*. [Experimental evaluation of antitumor drugs in the USSR and USA]. Moscow, 1980, 296 p. (in Russ.).
16. Lakin G.F. *Biometriya*. [Biometrics]. Moscow, 1980, 293 p. (in Russ.).
17. Seeram N.P. *J. Agric Food Chem.*, 2006, vol. 54, no. 25, pp. 9329–9339.
18. Bishayee A. et al. *Nat. Prod. Commun.*, 2010, no. 5, pp. 1613–1618.
19. Cai H. et al. *Eur. J. Cancer.*, 2010, vol. 46, pp. 811–817.
20. Hui C. et al. *Nutr. Cancer.*, 2010, vol. 62, pp. 1128–1136.
21. Adams L.S. *J. Nutr.*, 2011, vol. 141, pp. 1805–1812.
22. Devi P.S., Kumar M.S., Das S.M. *Int. J. Breast Cancer*, 2011, art. no. 891481, 6 p.

Received February 21, 2017

Revised July 4, 2017

* Corresponding author.

