

ПРОТИВООПИСТОРХОЗНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА ВАСИЛЕК (CENTAUREA) ФЛОРЫ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

И.П. Каминский, Т.В. Кадырова, В.В. Иванов, М.В. Белоусов
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ (г. Томск)

Antiopisthorchiasis activity of some Siberian flora Centaurea species

I.P. Kamisnkiy, T.V. Kadyrova, V.V. Ivanov, M.V. Belousov
Siberian State Medical University (Tomsk, Russia)

РЕЗЮМЕ

В экспериментах на золотистых хомяках-самцах исследована противоописторхозная активность (в отношении *Opisthorchis felineus*) экстрактов, полученных из *Centaurea scabiosa* L., *Centaurea pseudomaculosa* Dobroc. z., *Centaurea jaceae* L. и *Centaurea phrygia* L. семейства Asteraceae. Подтверждено наличие противоописторхозной активности у выделенного из *Centaurea scabiosa* L. сесквитерпенового лактона гваянового типа – цинаропикрина. Высказано предположение о наличии противоописторхозной активности у сесквитерпеновых лактонов гроссгемина и репина.

Ключевые слова: Описторхоз, *Opisthorchis felineus*, *Centaurea scabiosa*, *Centaurea pseudomaculosa*, *Centaurea jaceae*, *Centaurea Phrygia*, сесквитерпеновые лактоны, цинаропикрин, противоописторхозная активность.

RESUME

In experiments on the golden hamsters-males antiopisthorchiasis activity (with respect to *Opisthorchis felineus*) of extracts obtained from *Centaurea scabiosa* L., *Centaurea pseudomaculosa* Dobroc. z., *Centaurea jaceae* L. and *Centaurea phrygia* L. Asteraceae family was investigated. Antiopisthorchiasis activity of sesquiterpene lactone guainolide-type cynaropicrin isolated from *Centaurea scabiosa* L. was confirmed. It's suggested that sesquiterpene lactones grosshemin and repin has an antihelminthic activity.

Keywords: *Opisthorchis felineus*, *Centaurea scabiosa*, *Centaurea pseudomaculosa*, *Centaurea jaceae*, *Centaurea Phrygia*, sesquiterpene lactones, cynaropicrin, antiopisthorchiasis activity.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие печеночные гельминтные инфекции (энтеробиоз, аскаридоз, лямблиоз, описторхоз и др.) постепенно превращаются из локальной проблемы отдельных регионов в широко распространенную проблему глобального характера. Данная тенденция может быть связана с возрастающей интенсивностью транспортных потоков и миграцией инфицированных носителей [1].

Описторхоз, возбудителями которого являются *Opisthorchis felineus* и *Opisthorchis viverrini* – трематоды, принадлежащие к семейству Opisthorchiidae, относится к зооантропонозным заболеваниям [2]. Степень зараженности этим гельминтозом определяется этническими или традиционными особенностями питания и потреблением в пищу необеззара-

женной рыбы. Крупнейший в мире очаг описторхоза сформировался в Обь-Иртышском речном бассейне. В России ареал описторхоза, вызываемого *O. felineus* [3], простирается от бассейна Енисея до западных границ Европы. Ряд случаев заражения указанным гельминтом отмечен в странах ЕС: Италии, Германии, Польше, Португалии и Испании [4]. Очаги описторхоза, вызываемого *Opisthorchis viverrini*, имеются в странах Юго-Восточной Азии (Таиланд, Лаос, Вьетнам, Камбоджия) [5].

Огромная инвазированность населения разных регионов и стран представляет собой тяжелую гигиеническую, экологическую и общественную проблемы. Известно, что описторхозная инвазия сопровождается гепатомегалией, холангитом, фиброзом перипортальной системы, холециститом и др. заболеваниями

[6]. Кроме того, Международным агентством по изучению рака (IARC) и Всемирной организацией здравоохранения (WHO) возбудитель описторхоза отнесен к первой группе канцерогенов, т.к. является этиологическим фактором развития рака желчных протоков и холангиокарциномы [7].

В терапии описторхоза любого происхождения используют синтетический противопаразитарный препарат празиквантел, обладающий рядом побочных эффектов и противопоказаний [8]. В связи с этим возрастает актуальность поиска высокоэффективных и малотоксичных лекарственных средств для лечения описторхоза. Несмотря на существующие инструменты для моделирования химической структуры вещества в зависимости от свойств молекулярной мишени, скрининг молекул природного происхождения по-прежнему не теряет своей актуальности и является источником многих перспективных лекарственных кандидатов. В основном это связано с тем, что нативная химическая структура таких соединений, благодаря близости метаболизма растительной и животной клеток, способна обеспечивать эффективное фармакологическое взаимодействие, наряду с низкой вероятностью возникновения нежелательных побочных реакций организма.

Группа сесквитерпеновых лактонов, продуцируемых растениями семейства Asteraceae, является одним из ярких примеров биологически активных веществ, нашедших широкое применение в медицинской практике. Наибольший интерес представляют антипаразитарная (описторхоз, лямблиоз, малярия) и противоопухолевая виды активности сесквитерпеновых лактонов [9].

Данная статья посвящена обзору результатов экспериментальных исследований противоописторхозной активности сесквитерпеноидсодержащих растений рода *Centaurea*, а также активности их индивидуальных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования: *Centaurea scabiosa* L. (CS), *Centaurea pseudomaculosa* Dobroc. (CP), *Centaurea jaceae* L. (CJ) и *Centaurea phrygia* L. (CPH).

Наземную часть указанных растений собирали в фазе массового цветения в различных областях Сибирского федерального округа России в течение 2015 года: CS и CP – в Томской области (окрестности г. Томска); CJ

и CPH – в Кемеровской области (окрестности пос. Новобалахоновка). Растительный материал сушили воздушно-теньевым способом и измельчали до размера частиц не более 2 мм.

Экстрактивные комплексы растений получали методом бисмацерации с использованием воды очищенной, 40 % и 70 % этилового спирта. Растворители из полученных экстрактов удаляли под вакуумом в ротационном испарителе при температуре до 50 °С.

Сухие экстракты CS, CP, CJ и CPH на 70 % этаноле представляли собой вязкую массу темно-зеленого цвета со специфическим запахом, а при экстракции 40 % этанолом и водой – порошки коричневого цвета со специфическим запахом. Обнаружение сесквитерпеновых лактонов в сухих экстрактах проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series (США) в изократическом режиме в следующих условиях: аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C18 (4,6 x 150 мм, размер частиц – 5 мкм); состав подвижной фазы: метанол – вода в соотношении 50:50; детектирование при длине волны 204 нм; температура колонки – 25 °С; скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин.; объем вводимой пробы 20 мкл.

Для выделения цинаропикрина, который по данным литературы, может проявлять специфическую противоописторхозную активность [10], измельченное сырье CS подвергали 3-кратной экстракции смесью хлороформ-этанол 4:1 при соотношениях сырье-экстрагент 1:8, 1:7, 1:7 и нагревании до 60 °С. Продолжительность первой экстракции составляла 2 ч, последующих двух – 1 ч. Хлороформно-этанольные извлечения объединяли и растворитель удаляли на ротационном испарителе при температуре 40 °С. Полученные сгущенные экстракты растворяли в 2-х частях горячего этанола, прибавляли 1 часть воды, нагретой до 70 °С, и оставляли в темном месте на сутки. Выделившийся осадок отфильтровывали и дважды обрабатывали в указанных условиях. Для отделения парафиновой части объединенные фильтраты трижды экстрагировали в делительной воронке петролейным эфиром (фракция с температурой кипения 40–70 °С) при соотношении 1:1, а затем аналогичным образом – хлороформом для извлечения фракции сесквитерпеновых лактонов.

Разделение фракции сесквитерпеновых лактонов проводили методом колоночной хро-

матографии на силикагеле марки КСК с размером частиц 120/220 мкм. Элюентом служила смесь петролейного эфира с увеличивающимся градиентом этилацетата. Контроль за разделением осуществляли методом хроматографии в тонком слое на пластинках «Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ» (Россия) в подвижной фазе гексан-ацетон-уксусная кислота (20:10:0,1). Для сравнения использовали рабочие стандартные образцы сесквитерпеноидов, выделенных и идентифицированных нами ранее. При элюировании колонки смесью петролейного эфира и этилацетата в соотношении 80:20 получены фракции, содержащие сесквитерпеновый лактон гваянанового типа цинаропикрин [11–13]. Чистота выделенного соединения, установленная методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии, составила 85,4 %.

Модель экспериментального описторхоза воспроизводили на золотистых хомяках-самцах массой 40–45 г по общепринятой методике [14]. Для этого из зараженной *O. felineus* рыбы, преимущественно ельца и плотвы методом переваривания в искусственном желудочном соке выделяли метацеркарии *O. felineus*. Заражение животных осуществляли путем внутрижелудочного введения жизнеспособных метацеркариев в количестве по 50 экз. в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида. Золотистых хомячков содержали в условиях вивария при естественном световом режиме на стандартной диете при свободном доступе к воде и пище.

На 30-й день инвазии производили контрольное вскрытие нескольких животных. В результате исследования органов гепатобилиарной системы (печень, желчный пузырь) было выявлено значительное количество марит описторхов, что подтвердило факт развития описторхоза.

Противоописторхозное действие сухих экстрактов CS, CP, CJ и CPN, полученных на 70 %, 40 % этаноле и воде очищенной, а также цинаропикрина оценивали на 120 зараженных животных, масса которых на 30-й день инвазии возросла до 90–110 г.

Подопытные животные были распределены на 11 групп: группа №1 (интактная) – здоровые животные; группа №2 (контрольная) – животные с описторхозом. Группа №3 – животные больные описторхозом, получавшие препарат сравнения – празиквантел, в виде суспензии на 1 % крахмальной слизи в дозе 20 мг/кг массы животного 2 раза в день в течение

1 дня. Данная доза и схема введения максимально эффективны при лечении описторхоза, вызванного *O. felineus* [15].

Группы №№ 4–6 – животные больные описторхозом, получавшие сухие экстракты CS на 70 %, 40 % этаноле и воде очищенной, соответственно.

Группы №№ 7, 8 – животные больные описторхозом, получавшие сухие экстракты CP на 70 % и 40 % этаноле, соответственно.

Группы №№ 9, 10 – животные больные описторхозом, получавшие сухие экстракты CJ на 70 % и 40 % этаноле, соответственно.

Группа № 11 – животные больные описторхозом, получавшие сухой экстракт CPN на 40 % этаноле.

Поскольку указанные экстракты являются не токсичными (LD_{50} более 5000 мг/кг), то их вводили в максимально возможной разовой дозе 2,0 г/кг, ограниченной физиологическими возможностями экспериментальных животных, в виде суспензии на 1 % крахмальной слизи три раза в день в течение пяти дней.

Группа № 12 – животные больные описторхозом, получавшие цинаропикрин в дозе 40 мг/кг массы животного в виде суспензии на абрикосовом масле аналогично схеме введения празиквантела – два раза в день в течение одного дня.

Все исследуемые образцы вводили внутрижелудочно через металлический зонд; латентный период после окончания курсового лечения составил 14 дней. В течение указанного времени происходит естественное выведение марит описторхов, утративших жизнеспособность в результате лечения. По истечении этого срока животных усыпляли углекислым газом, извлекали печень и производили подсчет марит описторхов в органах гепатобилиарной системы (рассчитывали коэффициент интенсивности, являющийся критерием противоописторхозной активности) [14]:

$$ИЭ = \frac{K - O}{K} \times 100\%,$$

где K – среднее число марит *O. felineus* в контрольной группе;

O – среднее число марит описторхов в экспериментальной группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате исследования установлено, что наибольшей противоописторхозной активностью обладают экстракты *S. scabiosa*,

C. pseudomaculosa и *C. jaceae*, полученные с использованием в качестве экстрагента 40 % этанола: коэффициент ИЭ составил 71,6 %, 69,7 % и 68,11 % (табл. 1). При этом экстракт CS продемонстрировал уровень активности сопоставимый с препаратом сравнения празиквантелом (ИЭ празиквантела – 75,31 %).

Экстракт *C. scabiosa*, полученный на 70 % этаноле, проявил несколько меньшую активность – его показатель интенс-эффективности составил 64,11 %. Водный экстракт *C. scabiosa* проявил умеренную противоописторхозную активность (показатель ИЭ – 53,13 %).

Наиболее низкие показатели противоописторхозной активности продемонстрировали экстракты *C. pseudomaculosa* и *C. jaceae*, полученные на 70 % этаноле: их показатели ИЭ составили 32,86 и 30,33 %, соответственно. Экстракт *C. phrygia* практически не обнаружил активности (ИЭ – 14,28 %).

ОБСУЖДЕНИЕ

Для обоснования полученных результатов определения противоописторхозной активности было проведено сравнительное исследование химического состава наиболее эффективных экстрактов *C. scabiosa* и *C. pseudomaculosa* методом ВЭЖХ. В составе экстрактивного

комплекса CS, полученного с использованием 40 % этанола, обнаружены три сесквитерпеновых лактона гваянового типа – гроссгемин, репин и цинаропикрин (рис. 1) с количественным содержанием в образце 0,83; 0,45 и 1,23 %, соответственно (рис. 2). Экстракт CP, полученный тем же растворителем, содержит только гроссгемин и цинаропикрин с количественным содержанием в образце 0,7 % и 1,2 %, соответственно (рис. 3).

Указанные сесквитерпеновые лактоны являются известными соединениями и содержатся во многих представителях рода *Centaurea*. Гроссгемин [12], репин [13] и цинаропикрин [14] имеют очень близкое химическое строение (рис. 3) и, вероятно, представляют собой вторичные метаболиты одного биохимического пути исследованных растений.

Для подтверждения литературных данных о противоописторхозной активности цинаропикрина, было произведено его выделение из *C. scabiosa* с последующим фармакологическим исследованием. В эксперименте *in vivo* был подтвержден противоописторхозный эффект изолированного цинаропикрина (показатель интенс-эффективности составил 34,11 %).

Таким образом, результаты химико-фармакологического исследования не демонстри-

Таблица 1

Результаты исследования противоописторхозной активности экстрактивных комплексов *Centaurea scabiosa* L., *Centaurea pseudomaculosa* Dobroc., *Centaurea jaceae* L., *Centaurea phrygia* L.

Экспериментальная группа (исследуемый образец)	Кол-во животных, шт.	Доза, г/кг (схема введения)	ИЭ,%
Группа №1 (интактная – здоровые животные)	10	–	–
Группа №2 (контрольная – животные с описторхозом)	10	–	–
Группа №3 (празиквантел)	10	0,02 (2 раза в день – 1 день)	75,31 ± 1,24
Группа №4 (70 % этанольный экстракт CS)	10	2,0 (3 раза в день – 5 дней)	64,11 ± 2,17
Группа №5 (40 % этанольный экстракт CS)	10	2,0 (3 раза в день – 5 дней)	71,6 ± 2,99
Группа №6 (водный экстракт CS)	10	2,0 (3 раза в день – 5 дней)	53,13 ± 1,84
Группа №7 (70 % этанольный экстракт CP)	10	2,0 (3 раза в день – 5 дней)	32,86 ± 2,55
Группа №8 (40 % этанольный экстракт CP)	10	2,0 (3 раза в день – 5 дней)	69,70 ± 2,79
Группа №9 (70 % этанольный экстракт CJ)	10	2,0 (3 раза в день – 5 дней)	30,33 ± 1,87
Группа №10 (40 % этанольный экстракт CJ)	10	2,0 (3 раза в день – 5 дней)	68,11 ± 3,45
Группа №11 (40 % этанольный экстракт CPH)	10	2,0 (3 раза в день – 5 дней)	14,28 ± 8,08
Группа №12 (цинаропикрин)	10	0,04 (2 раза в день – 1 день)	34,11 ± 4,95

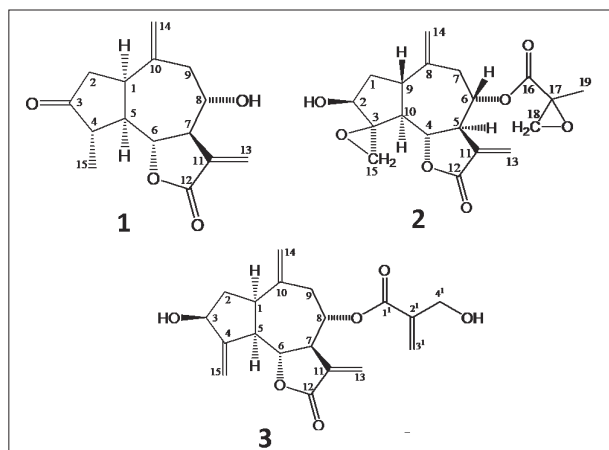


Рис. 1. Структурные формулы сесквитерпеновых лактонов, обнаруженных в растениях рода *Centaurea* (1 – гроссгемин; 2 – репин; 3 – цинаропикрин).

руют явную зависимость противоописторхозной активности наиболее эффективных экстрактивных комплексов CS и CP с наличием в их составе цинаропикрина. Это дает основание считать, что не только данное вещество вносит вклад в целевую активность.

Принимая во внимание близость химического строения содержащихся в экстрактах CS и CP сесквитерпеновых лактонов, возможно, что противоописторхозной активностью обладают все эти соединения. Так, наличие в 40 % этанольном экстракте CS трех сесквитерпеновых лактонов (цинаропикрин, гроссгемин и репин) обуславливает более высокую активность этого образца по сравнению с образцом CP, в котором репин отсутствует, и, соответственно, общее количественное содержание сесквитерпеноидов меньше.

С другой стороны, эффективность изолированного цинаропикрина в эксперименте оказалась значительно ниже эффективности

экстрактивных комплексов CS и CP. Вероятно, это обусловлено комплексным воздействием биологически активных веществ, входящих в состав этих растений, на различные звенья патогенеза описторхоза. Сесквитерпеновые лактоны, в частности цинаропикрин, способны оказывать прямое воздействие на мариит описторхов, в результате которого последние погибают либо их жизнедеятельность значительно нарушается, что приводит к их откреплению от стенок желчных протоков печени. Наряду с сесквитерпеновыми лактонами в состав экстрактов данных растений входят фенольные соединения, полисахариды, каротиноиды, аскорбиновая кислота и др., проявляющие антиоксидантное, гепатопротективное, желчегонное, детоксикационное, противовоспалительное и др. виды активности. Сочетанное воздействие этих групп биологически активных веществ способствует восстановлению функций печени, нарушенных в течение заболевания и увеличению эффективности лечения описторхоза.

В связи с этим, предварительные исследования позволяют считать *Centaurea scabiosa* L., *Centaurea pseudomaculosa* Dobroc., *Centaurea jaceae* L. перспективными для дальнейшего изучения с целью создания новых лекарственных средств для лечения описторхоза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В результате исследований в условиях *in vivo* установлены высокие показатели противоописторхозной активности экстрактов *Centaurea scabiosa*, *Centaurea pseudomaculosa* и *Centaurea jaceae* на 40 % этаноле (ИЭ – 71,6 %, 69,7 % и 68,11 %, соответственно). Аналогичный экстракт *Centaurea Phrygia* противоопи-

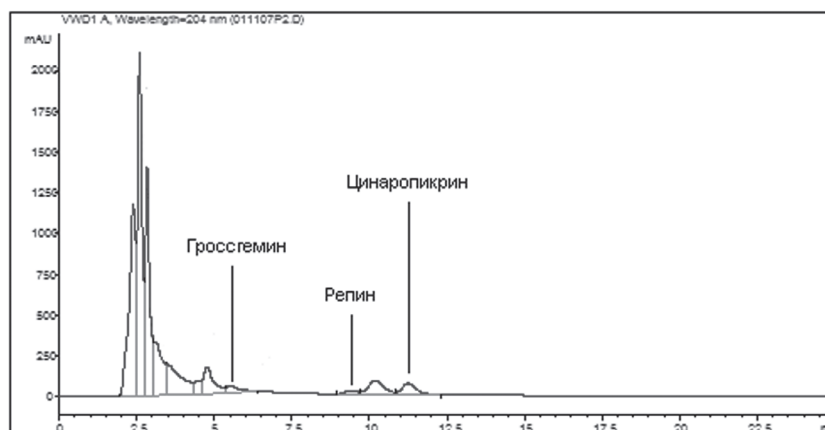


Рис. 2. Хроматограмма экстракта *Centaurea scabiosa* на 40 % этаноле (времена удерживания гроссгемина – 5,52 мин., репина – 9,4 мин., цинаропикрина – 11,21 мин.).

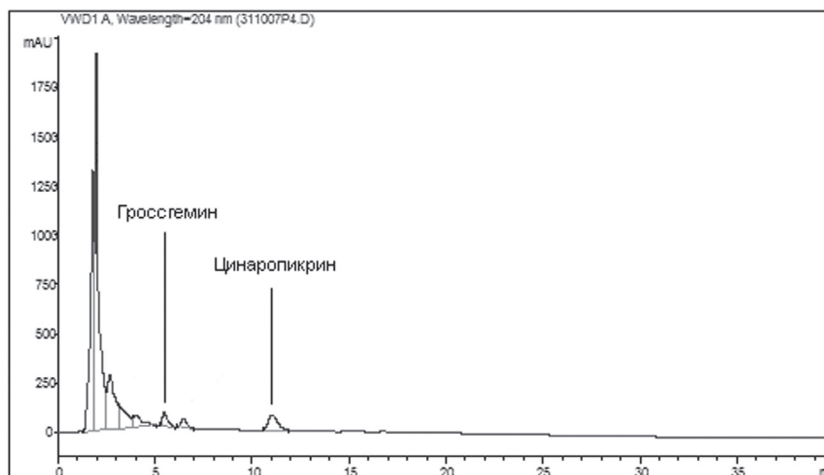


Рис. 3. Хроматограмма экстракта *Centaurea pseudomaculosa* на 40 % этаноле (времена удерживания гроссгемина – 6,08 мин., цинаропикрина – 11,65 мин.).

сторхозной активности не продемонстрировал. Подтверждена ранее описанная в литературе специфическая активность цинаропикрина (ИЭ – 34,11 %) методом ВЭЖХ в наиболее активном экстракте *Centaurea scabiosa* обнаружены сесквитерпеновые лактоны гваянового типа: гроссгемин (0,83 %), репин (0,45 %) и цинаропикрин (1,23 %); в экстракте *Centaurea pseudomaculosa* (40 % этанол) – гроссгемин (0,7 %) и цинаропикрин (1,2 %). Экспериментально обосновано предположение о возможном наличии противоописторхозной активности у других сесквитерпеновых лактонов растений рода *Centaurea*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Opisthorchis felinus and Metorchis bilis are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia / V. Mordvinov [et al.] // Parasit. Int. – 2011. – №61. – P.25–31.
2. P. Olson et al. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) // Int. J. Parasitol. – 2003. – Vol.33. – P.733–755.
3. Огородова Л.М. и др. Описторхоз в РФ. Взгляд на проблему в 21 веке / Науч. ред. Л.М. Огородова, А.Э. Сазонов; М-во здравоохранения РФ, Сиб. гос. мед. ун-т. – Новосибирск: Издательство СО РАН, 2016. – 130 с.
4. Pozio E. et al. Opisthorchis felinus, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union // Acta Tropica. – 2013. – №123. – P.54–62.
5. Sripa B. et al. Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos // Acta Tropica. – 2011. – № 120S. – P. S158–S168.
6. Sithithaworn P. et al. The current status of opisthorchiasis and clonorchiasis in the Mekong Basin // Parasit. Int. – 2012. – Vol. 61. – Is. 1. – P.10–16.
7. A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. World Health Organization, International Agency for Research

on Cancer IARC Biological agents. – 2012. – Vol. 100 B. – № 100. – 449 P.

8. Gouveia M. et al. Infection with Opisthorchis felinus induces intraepithelial neoplasia of the biliary tract in a rodent model // Carcinogenesis. – 2017. – Vol. 38. – Is. 9. – P.929–937.

9. Sut S. et al. New Drugs from Old Natural Compounds: Scarcely Investigated Sesquiterpenes as New Possible Therapeutic Agents // Curr. Med. Chem. – 2018 – Vol. 25 – №10 – P.1241–1258.

10. Pandey M.M., Rastogi S., Rawat A. K. S. Saussurea costus: botanical, chemical and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant // J. of Ethnopharmacol. – 2007. – №110. – P.379–390.

11. Krasnov E. et al. Isolation of grosheimin from the Siberian population of Centaurea scabiosa // Chem. of Nat. Comp. – 2006. – Vol. 42. – №4. – P.495–496.

12. Krasnov E. et al. Isolation of repin from the aerial part of Centaurea scabiosa // Chem. of Nat. Comp. – 2011. – Vol.47. – №2. – P.311–312.

13. Kaminskii I. et al. Quantitative HPLC determination of cynaropicrin in Centaurea Scabiosa dry extract // Pharm. Chem. J. – 2011. – Vol. 45. – Is. 9. – P.560–563.

14. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под общ. ред. д-ра мед. наук А.Н. Миронова. Часть первая. – М.: Гриф и К. – 2012. – С.445–453.

15. Бронштейн М.А., Лучшев В.И. Трематодозы печени: описторхоз, клонорхоз // Русский медицинский журнал – 1998. – Т. 6. – № 3. – С.140–148.

Адрес автора

Каминский И.П., сотрудник кафедры фармацевтического анализа
medicff@yandex.ru