

УДК 547.913.6;547.791.1;547.587.51

DOI: 10.15372/KhUR20180308

Доступные метаболиты растений Сибири как источники инновационных препаратов для медицины

Т. Г. ТОЛСТИКОВА, И. В. СОРОКИНА, Н. А. ЖУКОВА, Е. А. МОРОЗОВА, Ю. В. ХАРИТОНОВ, М. Е. МИРОНОВ,
С. А. ПОПОВ, Э. Э. ШУЛЬЦ

Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН,
Новосибирск (Россия)

E-mail: schultz@nioch.nsc.ru

(Поступила 04.05.18)

Аннотация

Представлен анализ некоторых результатов работ по направленной функционализации доступных метаболитов растений Сибири – ламбертиановой кислоты и бетулина – и созданию на их основе фармакологически перспективных противоопухолевых, гепатопротекторных, нейропротекторных и анальгетических агентов. Исследования выполнены сотрудниками отдела медицинской химии Новосибирского института органической химии СО РАН (Новосибирск). В последнее время в Сибири для нужд деревоперерабатывающей отрасли широко используют березу и кедр. Отходы этих производств (кора березы и хвоя кедра) представляют ценный источник биологически активных веществ для получения препаратов медицинского и ветеринарного назначения. Это определяет актуальность разработки экологически безопасных “зеленых” технологий выделения доступных метаболитов, способов их направленных химических модификаций и изучения фармакологической активности с целью создания инновационных лекарственных препаратов.

Ключевые слова: дитерпеноиды, лупановые тритерпеноиды, бетулин, биологическая активность

ВВЕДЕНИЕ

Природные соединения играют важную роль в процессе дизайна и создания лекарственных препаратов. Введенные в 1981–2014 гг. в медицинскую практику известные лекарственные препараты (общее число 1211) в основном представляют собой соединения, полученные методами органического синтеза (27 %). Второе место по численности занимают производные природных соединений, в том числе, полученные методами комбинаторного синтеза (21 %). Значительную группу составляют биологические макромолекулы (16 %). Отдельно выделены синтетические лекарственные препараты, содержащие фрагменты (15 %) и фармакофорные группировки природных соединений (10 %). Далее следуют вакцины (6 %),

чисто природные соединения (4 %) и растительные смеси (1 %) [1].

Современные тенденции по созданию ценных для медицины соединений на основе доступных веществ растительного происхождения указывают на перспективность работ, направленных на изучение химических свойств и синтетических возможностей растительных ди- и тритерпеноидов. Характеризуя биологическую активность растительных дитерпеноидов, в частности фуранолабданоидов, следует отметить их антиаллергенные, нейротропные, противовоспалительные и противоопухолевые свойства [2]. В плане создания противоопухолевых агентов значительный интерес представляют лупановые тритерпеноиды, в том числе бетулиновая кислота и ее производные [3]. Она обладает цитотоксич-

ностью в отношении ряда опухолевых клеток, включая клеточные линии рака простаты, кожи, легких и печени [4], ингибирует рост, пролиферацию и распространение клеток рака груди, включая линии опухолевых клеток MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453, BT474, влияет на клеточное деление в фазе G1 и индуцирует апоптоз при отсутствии действия на нормальные клетки [5]. Бетулиновая кислота относится к группе митокинов – соединений, влияющих на митохондрии клетки [4, 5]. Однако низкая биодоступность и неблагоприятные параметры адсорбции серьезно сдерживают ее использование в клинике. В этой связи значительное внимание уделяется разработке способов модификации указанных метаболитов (лабдановых дитерпеноидов и лупановых тритерпеноидов) и изучению их активности.

Настоящий обзор включает анализ некоторых полученных в НИОХ СО РАН результатов по созданию технологичных методов экстракции и окисления бетулина, получению азотсодержащих производных лабдановых и лупановых терпеноидов и изучению их биологической активности.

МАТЕРИАЛО- И ЭНЕРГОСБЕРЕГАЮЩИЕ ТЕХНОЛОГИИ ЭКСТРАКЦИИ И ОКИСЛЕНИЯ БЕТУЛИНА

Березовая кора является доступным источником пентациклических тритерпеноидов, в частности бетулина (содержание до 30 мас. %) – ценного синтона для получения биологически активных производных.

В большинстве известных работ по экстракции березовой коры основное внимание уделялось повышению эффективности извлечения ценных метаболитов (бетулина) с использованием полярных растворителей, в частности низших спиртов [6]. Менее изучены другие важные аспекты технологии экстракции, такие как рациональный выбор экстрагентов и их регенерация. Мы исследовали возможности использования растворителей средней полярности для организации эффективной экстракции и превращений тритерпеноидов.

Показано, что по сравнению с традиционным растворителем EtOH (95 %) при экстракции березовой коры растворителем средней полярности EtOAc или его смеси с водой

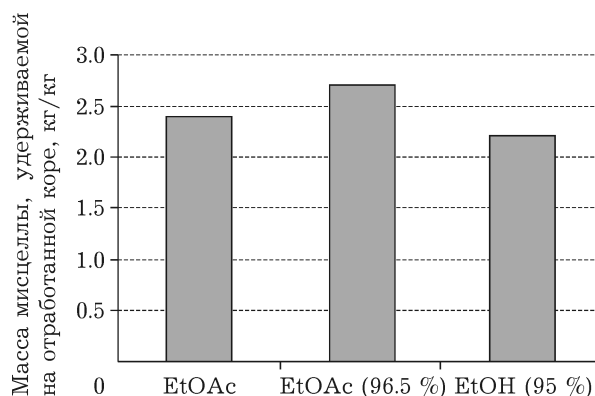


Рис. 1. Количество остаточной мисцеллы (мисцелла – экстрагент с растворенными экстрактивными веществами), удерживаемой берестой после экстракции.

EtOAc (96.5 %) получены экстракты с очень близкими выходами бетулина, но с меньшим содержанием полярных примесей [7].

Мы изучили проблемы, связанные с расходом экстрагентов и энергии на экстракцию. Количество удерживаемых растворителей на отработанном сырье составляет 2.3–2.8 кг/кг (рис. 1).

В пересчете на выход экстракта или бетулина потери растворителя на отработанном сырье могут достигать 6–9 или 10–15 кг/кг соответственно (до 20–30 % от общего количества экстрагента в цикле).

Удаление остаточных растворителей отжимом с отработанного сырья оказывается недостаточно эффективным. После отжима на гидравлическом прессе ($P = 100 \text{ кгс/см}^2$) остаточное содержание EtOH и EtOAc на коре составило 0.6–0.8 кг/кг. Наиболее полную регенерацию растворителя с сырьем обеспечивает гидродистилляция.

Нами рассмотрены два подхода к организации экстракции внешней березовой коры, различающиеся масштабом и способом регенерации экстрагента с сырьем (рис. 2).

В небольших и средних масштабах возможна организация периодического процесса экстракции бересты гидродистилляцией с регенерацией EtOAc с сырьем непосредственно в экстракционной аппаратуре [8]. Конденсация отгоняемого азеотропа приводит к образованию органической (EtOAc ~ 3.5 % H_2O) и небольшого количества водной фазы (~8.7 % EtOAc). Во избежание потерь EtOAc отделен-

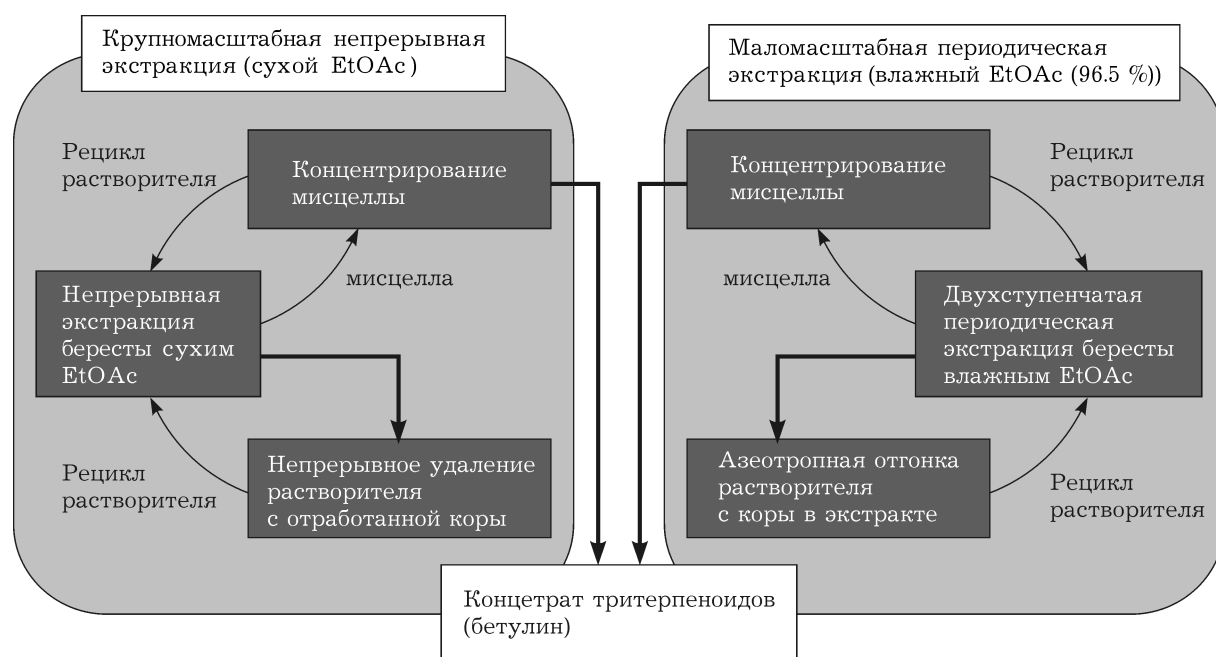


Рис. 2. Блок-схемы экстракционных циклов с полной регенерацией растворителя в больших и малых масштабах.

ную водную фазу используют в следующих циклах гидродистилляции. Остаточный растворитель с концентрата бетулина также удаляют с водяным паром (рис. 3).

Энергетические затраты на осуществление процесса складываются из затрат на экстракцию (нагрев растворителя и сырья), концентрирование экстракта и регенерацию растворителя с отработанного сырья. Для организации крупномасштабного процесса возможен вариант с непрерывной экстракцией бересты сухим горячим EtOAc. В этом случае регенерация с отработанного сырья осуществляется в аппарате-десольвентайзере непрерывного действия. Таким образом, для непрерывной экстракции и регенерации требуются специализированное оборудование и значительные капитальные затраты. Результаты сравнительного анализа энергозатрат на экстракцию с использованием различных растворителей и их полной регенерацией приведены на рис. 4.

Видно, что основные энергозатраты связаны с концентрированием экстракта (1-й мисцеллы). Хотя они сопоставимы для всех сравниваемых экстрагентов, расходы энергии на регенерацию остаточного экстрагента с сырья в процессе экстракции EtOH (95%) выше в 1.5 и 1.1 раза, чем в случае сухого EtOAc и

влажного EtOAc (96.5%) соответственно. Мы рассмотрели также случай, когда после экстракции EtOH (95%) растворитель не удаляют с отработанного сырья. Из данных рис. 4 видно, что даже без учета затрат на регенерацию растворителя с отработанного сырья в процессе с использованием EtOH (95%) общие теплотраты выше, чем в схемах с использованием EtOAc, включая рекуперацию растворителя из экстрагированной коры.

В связи с этим использование растворителя средней полярности (EtOAc) для извлечения тритерпеноидов из бересты более энергоэффективно. Тритерпеноиды с массивным углеродным скелетом, содержащие стерически затрудненные функциональные группы, могут рассматриваться как низкополярные соединения, поэтому растворители такого типа хорошо их экстрагируют. По сравнению со спиртами они извлекают меньше полярных примесей, а на регенерацию экстрагента требуются меньшие энергозатраты. Для организации периодических процессов экстракции и переработки в небольших и средних масштабах с полным циклом растворителя возможно использование стандартного неспециализированного оборудования.

Другой пример материало- и энергосберегающей технологии – использование раство-

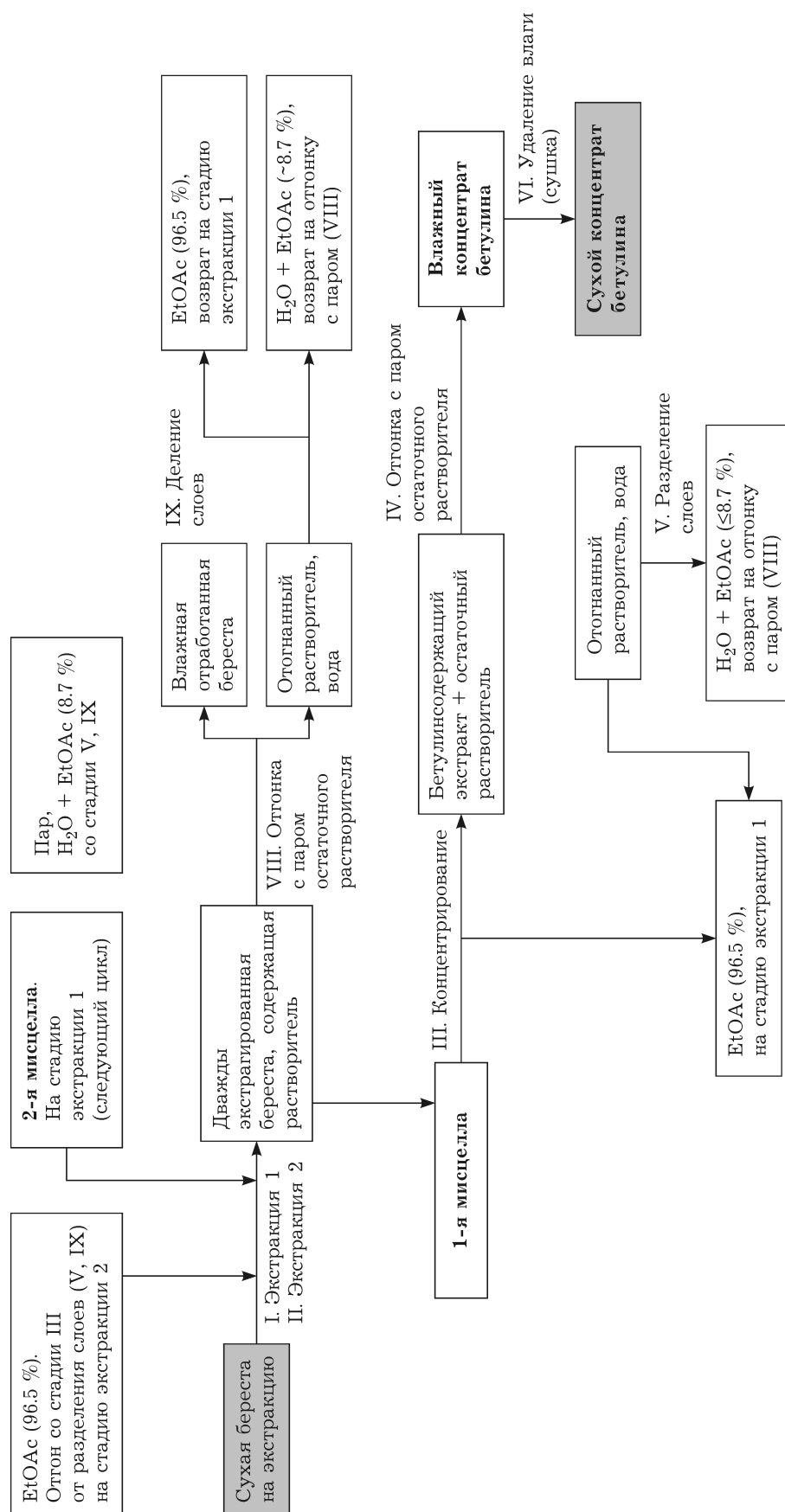


Рис. 3. Схема периодической двухстадийной экстракции берберина с полным рециклом экстрагента гидроdistилляцией ($EtOAc$ 96.5 %). 1-я, 2-я мисцелла – слитый экстрагент, содержащий экстрактивные вещества после 1-й и 2-й стадии экстракции соответственно; I–IX – основные операции по экстракции и обработке экстракта.

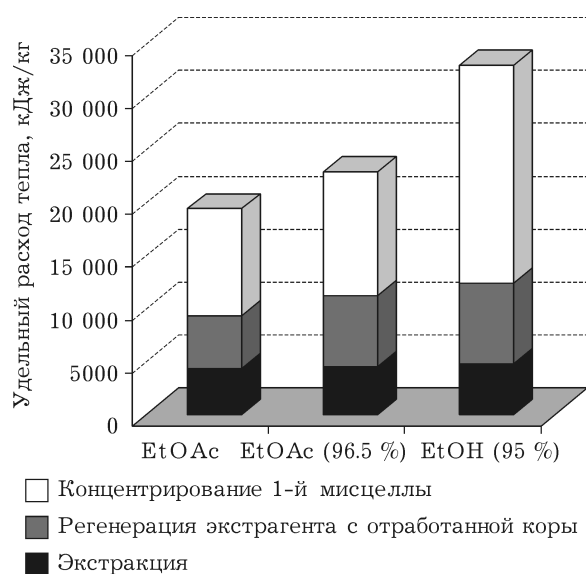


Рис. 4. Сравнительная оценка удельного расхода тепла на экстракцию березовой коры с использованием различных растворителей: EtOAc, влажного EtOAc (96.5 %), этанола EtOH (95 %).

рителя средней полярности *t*-BuOMe как универсальной среды для экстракции березовой коры и окисления бетулина в бетулоновую кислоту [9]. Обычно в технологической последовательности для экстракции, окисления бетулина и очистки бетулоновой кислоты последовательно используют 5–7 видов растворителей. *t*-BuOMe эффективно растворяет бетулин, плохо экстрагирует полярные примеси и слабо смешивается с водой [10]. Процессы нейтрализации избытка Cr^{6+} , отделения нейтральных примесей после окисления также осуществляют в *t*-BuOMe. Таким образом, разработанный способ обеспечивает многократное применение единственного растворителя *t*-BuOMe в экстракции сырого бе-

тулина, его окисление и разделение нейтральных побочных продуктов (рис. 5). Эфир регенерируют и используют в следующих циклах экстракции [11].

ПРОИЗВОДНЫЕ ЛАБДАНОВЫХ ДИТЕРПЕНОИДОВ

Дитерпеноиды *Pinus sibirica*

К числу доступных для модификации лабданных дитерпеноидов относятся ламбертиановая кислота **1** и ее метиловый эфир **2**. Будучи легкодоступными соединениями из живицы [12], хвои и обесхвоенных побегов сосны сибирской *Pinus sibirica* R. Mayr. [13], они обладают ценными биологическими свойствами. При исследовании фармакологической активности ламбертиановой кислоты выявлена ее антидепрессантная активность с седативным компонентом [14]. В работе [15] отмечается значительный потенциал этого дитерпеноида в качестве агента для лечения аллергии. Получены данные по ее действию на медиаторы аллергии, включая ингибирование продукции интерлейкина-6 (IL-6), простагландина D₂ (PGD₂), лейкотриена C₄ (LTC₄), экспрессию циклооксигеназы-2 (COX-2) и дегрануляцию β-гексозаминидазы в РМА (форболовый эфир). Для метилового эфира ламбертиановой кислоты **2** выявлены свойства стимулирующего антидепрессанта [16]. Доступность растительных фуранолабданоидов определяет интерес к получению на их основе других природных метаболитов и практически ценных веществ.

Ламбертиановая кислота **1** при действии *para*-толуолсульфокислоты в кипящем бензоле гладко претерпевает изомеризацию, приводящую к фломизоиковой кислоте **3** [17]. Аналогичное превращение с образованием метилово-

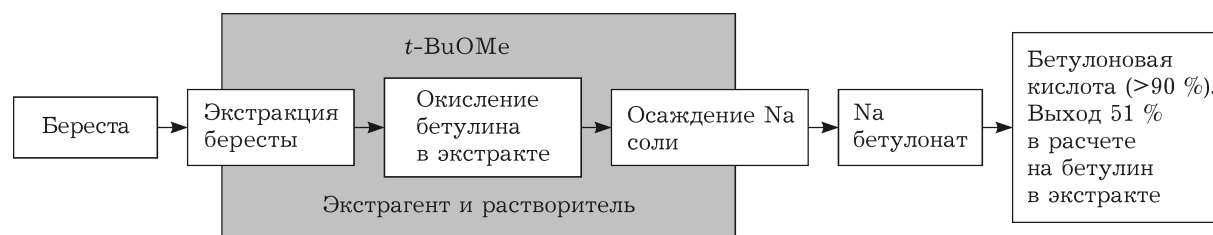


Рис. 5. Блок-схема экстракции бересты *t*-BuOMe с последующим окислением бетулина и очисткой бетулоновой кислоты через соль (чистота получаемой бетулоновой кислоты >90 %).

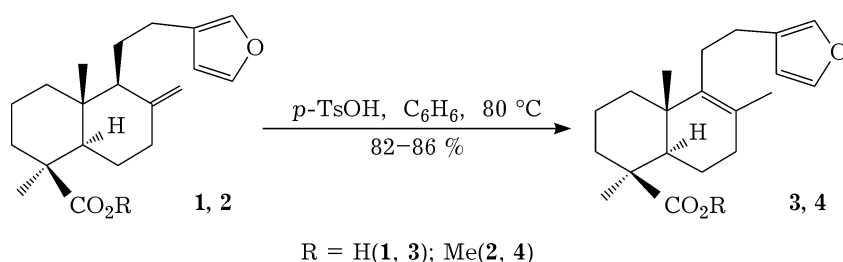
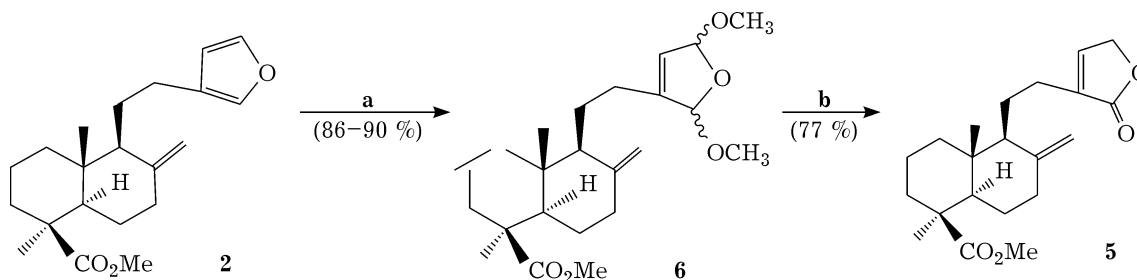


Схема 1.



a: PhSO₂NHCl, MeOH или NBS, MeOH; b: HCl, 1,4-диоксан

Схема 2.

го эфира фломизоиковой кислоты **4** претерпевает и метилламбертианат **2** [18] (схема 1).

В работе [19] описан практичный синтез дитерпеноида пинусолида **5** (схема 2), который включает окислительное метоксилирование метилламбертианата **2** действием хлорамин В (или NBS) и последующую обработку дитерпеноидных 2,5-диметоксидигидрофуранов **6** действием соляной кислоты.

Дитерпеноид пинусолид **5** выделен из живицы *Pinus sibirica* [20], *Pinus koraiensis* [21], а также из лекарственного растения *Biota orientalis* [22, 23]. Антилейкемический и хемопревентивный потенциал соединения **5** изучен *in vitro* на клеточной линии лимфомы Беркитта ВЈАВ [19]. Показано, что пинусолид не только снижает пролиферативную активность опухолевых клеток в относительно низких концентрациях, но и специфично индуцирует апоптоз у 70 % клеток в концентрации 100 мкМ. Апоптоз клеток линии ВЈАВ (клеточная линия лимфомы Беркитта) опосредован потерей потенциала митохондриальной мембраны. По сути, пинусолид в концентрации 100 мкМ приводит к потере потенциала митохондриальной мембраны, что указывает на внутренний митохондриальный механизм апоптоза в соответствующем сигнальном пути гибели клетки. Значительная индукция апоп-

тоза пинусолидом (100 мкМ) наблюдалась также в эксперименте *ex vivo*. При этом фрагментация ДНК происходила как в первичных лимфобластных клетках, так и в лейкоцитах. Пинусолид *ex vivo* преодолевал устойчивость к антрациклину первичных лимфобластов, полученных от пациентов с высоким риском острой лимфобластной лейкемии (ОЛЛ) и слабым ответом на химиотерапию [19]. Авторы работы [24] охарактеризовали пинусолид в качестве нового антагониста фактора агрегации тромбоцитов. Нейропротективная активность пинусолида **5** (из *Biota orientalis*) исследована в работе [25].

Синтезированы некоторые доступные производные фуранолабданоидов по карбоксильной функции. Амид ламбертиановой кислоты **7** (с выходом 91 %) получен взаимодействием ламбертиановой кислоты **1** с хлористым тионилом и последующей обработкой хлорангидрида **8** водным аммиаком (схема 3).

На основе фломизоиковой кислоты **3** синтезировали N,N'-(этан-1,2-диил)- (**9**) и N,N'-(гексан-1,6-диил)бис(лабдатриен-4-карбоксамиды) (**10**) (схема 4). Бис(лабдатриенкарбоксамиды) **9** и **10** получали конденсацией хлорангидрида фломизоиковой кислоты **11** с этилендиамином или гексаметилен-1,6-диамином соответственно. Хлорангидрид **11** количественно

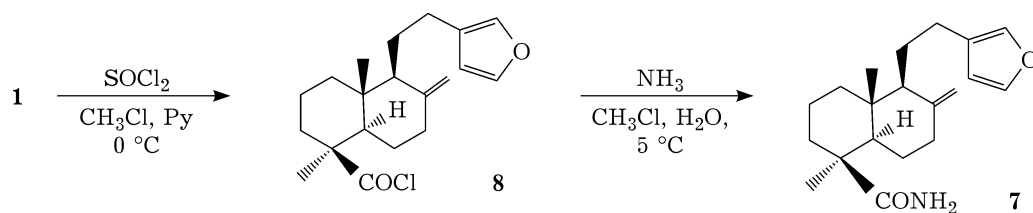


Схема 3.

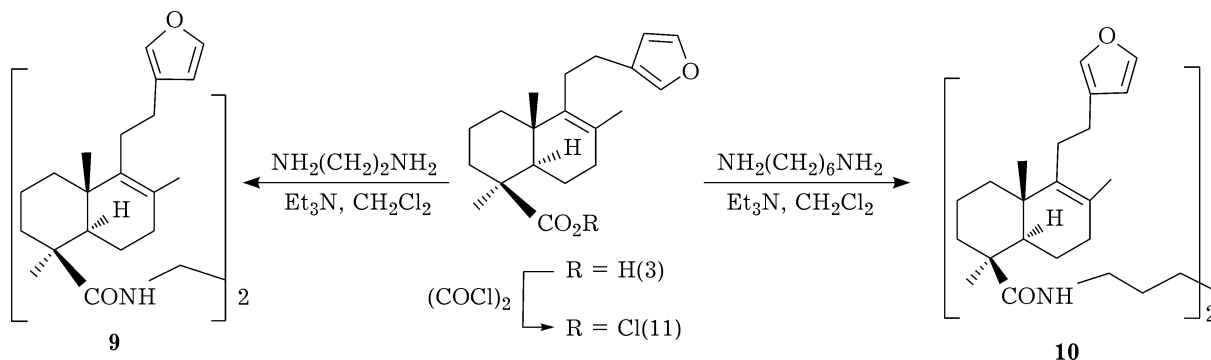


Схема 4.

но образуется при обработке соединения **3** хлористым оксалилом в CH_2Cl_2 в присутствии триэтиламина.

Биологическая активность амида ламбертиановой кислоты **7, механизм его действия на структуры мозга и отдельные медиаторные системы**

Анальгетическая активность. Известно, что экстракты лекарственных растений семейства губоцветные (Lamiaceae) – *Phlomis* sp. и *Eremostachys* sp., содержащие гликозиды фло-

мизоиковой кислоты **3**, обладают анальгетической активностью [26]. Она была выявлена в тесте “укусные корчи” *in vivo* для растительных дитерпеноидов маррубина [27] и сальвинорина А – метаболита психоактивного растения *Salvia divinorum* [28]. Это открытие стимулировало дальнейшее изучение биологической активности ламбертиановой **1** и фломизоиковой кислот **3**, а также амида ламбертиановой кислоты **7**.

Анальгетическая активность оценивалась по уменьшению болевой реакции, вызванной химическим раздражением брюшины (“укус-

ТАБЛИЦА 1

Влияние ладаноидов **1**, **3**, **7**, на болевую реакцию, вызванную термическим и химическим раздражением

Группа	Модель		Острая токсичность (LD_{50}), мг/кг
	“Укусные корчи” Количество корчей	УБР, %	
Контроль	8.6±1.1	–	–
1	7.2±0.8	16.0	920
3	5.5±0.7*	35.9	633
7	4.2±0.7*	51.5	1500
Анальгин	5.7±0.4*	33.6	–

Примечание. УБР – уменьшение болевой реакции.

* $p < 0.05$.

ные корчи”), а также по термической чувствительности животных (время нахождения животных на горячей пластине) [29]. Из данных табл. 1 видно, что в тесте “уксусные корчи” агент **7** проявляет себя более эффективным ингибитором болевой реакции, чем используемый в медицине анальгетик – анальгин. По анальгетической активности фломизоиковая кислота **3** сопоставима с анальгином.

В тесте термической чувствительности животных соединения **1**, **3** и **7** не проявили достоверного анальгетического эффекта. Таким образом, на модели висцеральной боли выявлена селективная анальгетическая активность амида ламбертиановой кислоты (**7**), а также фломизоиковой кислоты **3**.

Для соединений **1**, **3** и **7** по методу Кербе-ра определена острая токсичность (LD_{50}) при однократном внутривенном введении мышам. Полученные данные (см. табл. 1) позволяют отнести исследуемые соединения к 3-му классу (умеренно токсичные вещества).

Изменение двигательной активности животных под действием амида ламбертиановой кислоты **7.** Стимулирующую активность соединения **7** устанавливали по поведению животных в тесте “открытое поле” [31], двигательную – по параметрам “дистанция” и “скорость”, исследовательскую – по количеству вертикальных стоек, времени нахождения в них, количеству и времени заглядываний в отверстия. Из данных табл. 2. следует, что в данном тесте соединение **7** существенно влияет на поведение животных [30]. При внутривенном введении в дозе 5.0 мг/кг соединение проявляет выраженное стимулирующее

действие; увеличивается скорость движения животных и пройденное ими расстояние, а также время нахождения в вертикальных стойках и их количество. Влияние соединения носит дозозависимый характер: в дозе 2.5 мг/кг поведенческие реакции животных по двигательной и исследовательской активности практически не отличаются от контроля. В дозе 10.0 мг/кг стимулирующее действие по параметрам двигательной активности (дистанция и скорость) становится более выраженным (в 1.2–1.3 раза), чем в дозе 5.0 мг/кг. Общая исследовательская активность грызунов при введении **7** в дозе 10.0 мг/кг достоверно возрастает в два раза по сравнению с контролем.

В табл. 3 приведены данные по противотревожной активности животных в тесте “темная и светлая камеры”, который основан на том, что животные с повышенным уровнем тревожности предпочитают находиться в темной камере, а с низким – в светлом отсеке камеры. В качестве препарата сравнения использован диазепам в дозе 2.5 мг/кг, при введении которого достоверно увеличивались оба показателя. Из полученных данных следует, что амид ламбертиановой кислоты **7**, в отличие от диазепама, не влияет ни на латентное время первого захода животного в темную камеру, ни на время его нахождения в ней. Следовательно, введение соединения **7** не приводит к повышению уровня тревожности, а его положительное влияние на исследовательскую активность животных, выявленное в тесте “открытое поле”, по-видимому, обусловлено способностью оказывать общее стимулирующее действие.

ТАБЛИЦА 2

Влияние амида ламбертиановой кислоты **7** на поведение животных в тесте “открытое поле” (внутрижелудочное введение)

Доза 7 , мг/кг	Показатель							
	Дистанция, см	Скорость, см/с	Количество вертикальных стоек	Время вертикальных стоек, с	Количество заглядываний	Время заглядываний, с	Количество прыжков	Исследова- тельская активность
Контроль	268.0±18.4	2.2±0.2	7.0±1.9	10.1±3.0	4.1±1.1	5.5±1.6	0.6±0.4	11.1±2.6
2.5	264.6±19.3	2.2±0.2	6.4±1.4	9.5±2.1	4.5±1.1	5.8±1.0*	0.8±0.2	10.9±1.5
5.0	328.3±21.6*	2.7±0.2*	12.0±2.1*	18.5±3.1**	6.0±1.0*	7.4±1.3**	0.8±0.6	18.0±1.9**
10.0	379.3±23.1 [#]	3.1±0.2**	14.3±0.7**	21.1±2.8 [#]	6.1±0.4	7.8±0.6	1.3±0.4*	21.4±1.9 [#]

* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; [#] $p < 0.01$ относительно контроля.

ТАБЛИЦА 3

Влияние амида ламбертиановой кислоты **7** на поведение животных в тесте “темная и светлая камеры”

Группа	Параметр	
	Латентное время захода в темный отсек камеры, с	Время в нахождения в темной камере, с
Контроль	58.28±9.18	93.21±6.64
7	48.72±6.12*	85.50±7.35*
Диазепам	132.00±22.70**	159.87±11.48 [#]

* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; [#] $p < 0.01$ относительно контроля.

Известно, что стимулирующее действие агентов реализуется через различные нейромедиаторные системы. Для исследования *in vivo* влияния соединений на глутаматную и ГАМК-эргическую систему используется тест “хлоралгидратовый сон” [31]. Действие амида ламбертиановой кислоты **7** изучали по влиянию на снотворный эффект хлоралгидрата (табл. 4), который в количестве 350 мг/кг вводили внутрибрюшинно через 1 ч после введения агента, оценивали латентное время засыпания и продолжительность сна животных. Исследование показало, что амид **7** в дозе 5 мг/кг не изменяет латентное время засыпания животных, в то время как диазепам достоверно уменьшает его. Соединение **7** практически не влияет на продолжительность хлоралгидратового сна, диазепам увеличивает его в два раза.

Таким образом, по результатам исследования поведенческих реакций животных в тестах “открытое поле”, “темная и светлая камеры”, а также влияния на снотворный эффект хлоралгидрата установлено, что амиды ламбертиановой кислоты (см. схему 1, соединения **1**, **2**) обладают общим выраженным стимулирующим действием.

Исследование механизмов действия амида ламбертиановой кислоты на фоне влияния социального стресса. Обнаружено, что амид ламбертиановой кислоты **7** в условиях социального дискомфорта самок мышей (проживание в клетке с агрессивным самцом, помещенным за прозрачную перфорированную перегородку, и ежедневное присутствие при межсамцовых конфронтациях) оказывает выраженный стресс-протекторный эффект: повышает коммуникативность, двигательную активность животных, уменьшает гипертрофию надпочечников [32].

Выполненные эксперименты на срезах гиппокампа включали определение способности амида **7** к поддержанию функционирования НМДА-рецептор-канального комплекса при отсутствии эндогенного лиганда (ионов магния) и изучение НМДАР-зависимой синаптической потенциации в физиологических условиях. В экспериментах показано, что амид **7** может оказывать воздействие непосредственно на нервную ткань (срезы гиппокампа). Выявлен выраженный нейропротекторный эффект [33].

По совокупности выявленных эффектов и умеренной острой токсичности амид ламбер-

ТАБЛИЦА 4

Влияние соединения **7** на длительность хлоралгидратового сна

Группа	Параметр	
	Латентное время засыпания, с	Длительность сна, мин
Контроль	240.62±13.57	86.77±8.74
7	266.25±17.84*	105.76±10.38**
Диазепам	192.50±18.02**	207.79±6.19 [#]

* $p < 0.1$; ** $p < 0.05$; [#] $p < 0.01$ относительно контроля.

тиановой кислоты **7** (LD_{50} 1500 мг/кг по методу Кербера) можно рекомендовать для углубленных доклинических исследований в качестве нейропротектора.

Противоопухолевая активность *N,N'*-(алкандиил)-бис[лабда-7(9),13,14-триен-4-карбоксамидов]

Растительные дитерпеноиды представляют интерес в качестве ингибиторов тканевой инвазии и индукторов апоптоза опухолевых клеток, что определяет перспективность поиска в этом ряду цитостатических агентов для противоопухолевой терапии [34]. Помимо характеристики противоопухолевого потенциала соединения-лидера пинусолида **5** [19], нами получены данные по цитотоксической и противоопухолевой активности бис(лабдатриенкарбоксамидов) **9** и **10**. Цитотоксическая активность соединений (GI_{50}) изучалась по способности подавлять рост опухолевых клеток в следующих культурах: МТ-4 (лимфоциты Т-клеточной лейкемии), ВТ-474 с высокой экспрессией HER-2 (рак молочной железы), MDA-MB-231 и MCF-7 с низким уровнем экспрессии HER-2 (рак молочной железы), клетки меланомы MEL-8 (табл. 5). Для определения GI_{50} использовали стандартный МТТ-тест [35]. Установлено, что соединение **10** обладало наибольшей цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток меланомы MEL-8 (4.16 мкМ) и ВТ-474 (5.33 мкМ). Бис(лабдатриенкарбоксамид) **10** в пять раз более активный ингибитор жизнеспособности опухолевых клеток MEL-8 по сравнению с соединением **9** и в 8–10 раз – по сравнению с фломизоиковой кислотой **3**. Соединение **10** проявляет ингибирующую активность для клеток

Т-клеточной лейкемии МТ-4 (7.17 мкМ) и в 5–7 раз более активный ингибитор жизнеспособности этих клеток, чем соединение **9**. При этом для **9** наблюдалась селективность по отношению к опухолевым клеткам ВТ-474. По цитотоксической концентрации на опухолевых клетках меланомы MEL-8 и рака молочной железы MDA-MB-231 соединение **10** сопоставимо с доксорубицином [36].

Противоопухолевое действие бислабданоидов **9** и **10** исследовали *in vivo* на мышцах линии СВА массой 25–30 г, которым трансплантировали внутримышечно клетки злокачественной мышшиной лимфомы RLS, резистентной к циклофосфану (500 тыс. клеток). Данный штамм лимфомы растет в виде солидного узла, характеризуется быстрым прогрессивным ростом. Изучаемые соединения **9**, **10** вводили в курсовом режиме внутрижелудочно, начиная с пятых сут после перевивки в режиме четыре раза через 1 сут в дозе 100 мг/кг в виде суспензии в воде с Твином-80 (общая курсовая доза 400 мг/кг). Эталонном противоопухолевого действия служил эффект комплекса цитостатических препаратов, вводимых однократно референсной группе мышей по стандартной схеме полихимиотерапии (ПХТ) СНОР: циклофосфан (50 мг/кг), доксорубин (4 мг/кг), винкристин (0.1 мг/кг) и преднизолон (5 мг/кг). Контролем были животные с опухолью без лечения. Размеры опухолевых узлов измеряли в динамике на стадии прогрессивного роста опухоли. Результаты измерений размеров опухоли в период введения агентов представлены в табл. 6 [36]. Противоопухолевый эффект оценивали по индексу торможения роста опухоли (ТРО), определенному как разность средних разме-

ТАБЛИЦА 5

Цитотоксическая активность бис(лабдатриенкарбоксамидов) **9** и **10** в отношении линий опухолевых клеток человека

Соединение	GI_{50} , мкМ			
	МТ-4	MEL-8	MDA-MB-231	ВТ-474
Доксорубин	2.81±0.82	5.12±0.51	7.91±0.54	3.47±0.08
Фломизоиковая кислота 3	24.51±2.25	37.11±3.55	27.76±2.51	Н. д.
<i>N,N'</i> -(этан-1,2-диил)бис(лабдатриен-4-карбоксамид) 9	41.36±5.44	21.08±3.23	16.33±1.98	5.77±1.09
<i>N,N'</i> -(гексан-1,6-диил)бис(лабдатриен-4-карбоксамид) 10	7.17±1.19	4.16±0.39	9.87±1.84	5.33±0.86

Примечания. 1. GI_{50} – концентрация вещества, при которой наблюдалось 50 % ингибирование роста опухолевых клеток после 72 ч инкубирования. 2. Н. д. – нет данных.

ТАБЛИЦА 6

Изменение размеров трансплантатов лимфомы RLS у мышей в период внутрижелудочного введения агентов **9**, **10**

Группа	Размеры опухоли, см ³			
	Время, сут			
	10	13	15	17
Контроль	0.61±0.05	1.31±0.07	1.89±0.16	3.14±0.29
ПХТ СНОР	0.51±0.06	0.79±0.08**	1.51±0.04*	2.58±0.14*
9	0.58±0.09	0.83±0.19	1.48±0.33	1.81±0.55*
10	0.46±0.06	0.66±0.13 [#]	1.07±0.26*	1.68±0.44*

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ различия с контролем достоверны.

[#] $p < 0.001$ различия с ПХТ достоверны.

ров опухолей в контрольной и опытной группах, отнесенная к среднему размеру опухолей в контроле. Установлено, что в ранние сроки наблюдения (13-е сут после перевивки) агенты **9**, **10** не уступали ПХТ по противоопухолевому эффекту, а в конце этого периода (17-е сут) оба агента превосходили эффект противоопухолевой химиотерапии (см. табл. 6). При этом наиболее стабильно высокий и достоверный эффект демонстрировало соединение **10** – бис(амидолабданоид), имеющий линкерную цепочку из шести атомов углерода.

В дополнительном эксперименте на мышах, которым имплантировали вышеуказанную опухоль, изучали противоопухолевый эффект соединения **10** в сравнении с паклитакселем. Агент **10** вводили внутрижелудочно в виде раствора в подсолнечном масле в дозе 100 мг/кг трижды через 1 сут (курсовая доза 300 мг/кг, через 2 сут после перевивки). Референтной группе вводили водный раствор паклитаксела в дозе 30 мг/кг, а контрольной группе – подсолнечное масло в количестве 100 мг/кг. Размер опу-

холи определяли через 2 сут после отмены введения соединений или с 11-е по 18-е сут после перевивки (до начала гибели животных в группах). Результаты исследования приведены в табл. 7. Установлено, что соединение **10** оказывает противоопухолевое действие, выражающееся в достоверной задержке ее роста и по эффекту не уступающее паклитакселю, но имеет более короткую продолжительность действия после отмены введения (на 18-е сут – данные не достоверны) [36].

Таким образом, бислабданоиды **9** и **10** при курсовом внутрижелудочном введении мышам оказывают противоопухолевое действие, выражающееся в задержке роста злокачественной опухоли. При этом соединение **9** не уступает, а **10** превосходит по эффективности цитостатическую ПХТ по стандартной схеме СНОР. Результаты, достигнутые на перевиваемой лимфоме, резистентной к циклофосфану, свидетельствуют о потенциальной способности этих бислабданоидов преодолевать феномен лекарственной устойчивости опухолевых штаммов.

ТАБЛИЦА 7

Изменение динамики роста трансплантатов лимфомы RLS у мышей после внутрижелудочного введения агента **10** или паклитаксела

Группа	Размеры опухоли, см ³			
	Время, сут			
	11	13	15	18
Контроль (подсолнечное масло)	0.42±0.03	1.38±0.13	2.64±0.27	4.41±0.30
Паклитаксел, 30 мг/кг	0.40±0.05	1.10±0.15	1.85±0.17*	3.28±0.29*
10 , 100 мг/кг	0.30±0.04*	0.83±0.08**	1.96±0.14*	4.00±2.00

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ различия с контролем достоверны.

ТРИТЕРПЕНОИДЫ ЛУПАНОВОГО РЯДА

Бетулин **11** (рис. 6) – высокоперспективное базовое соединение, на основе которого получены новые избирательно действующие лекарственные агенты с более высокими биологическим потенциалом и гидрофильностью по сравнению с прототипом (соединением-лидером), бетулиновой кислотой **12**. Возможности структурных модификаций бетулина по различным положениям лупанового остова без изменений углеродного скелета обсуждались в нескольких обзорах [37, 38]. Значительное внимание уделяется получению производных бетулина в условиях металлокомплексного катализа [39, 40]. К настоящему времени получен большой массив данных по зависимости между структурой и противоопухолевой активностью производных бетулина и бетулиновой кислоты [41]. Мы обратили внимание на возможности введения азотсодержащих гетероциклических заместителей по изопропильной группе [42] и по положению С-30 лупанового остова [43]. Нами осуществлен синтез широкого ряда амидов бетулоновой кислоты **13** взаимодействием хлорангидрида бетулоновой кислоты с различными аминами [44,

45]. Их выбор обусловлен доступностью и возможностью получения продуктов с селективным фармакологическим действием (использование фармакофорных аминов). Не только выявленные закономерности протекания изучаемых реакций, но и сами синтезированные соединения могут быть значимы в качестве новых биологически активных агентов. В ряду С-30 триазолилзамещенных производных лупанов найдены перспективные цитотоксические агенты. На рис. 6 приведены структуры наиболее перспективных соединений α - и β -аланинамида бетулоновой кислоты (**14** и **15** соответственно).

Изучение фармакологических свойств β -аланинамида бетулоновой кислоты **15**

Бетамид – производное бетулоновой кислоты, содержащей в боковой цепи в положении С-28 аминокислотный остаток β -аланина **15**, относится к малотоксичным веществам ($LD_{50} > 5000$ мг/кг, однократное внутрижелудочное введение), не обладает местно-раздражающим, аллергическим, мутагенным, эмбриотоксическим действием, не оказывает кумулятивного эффекта.

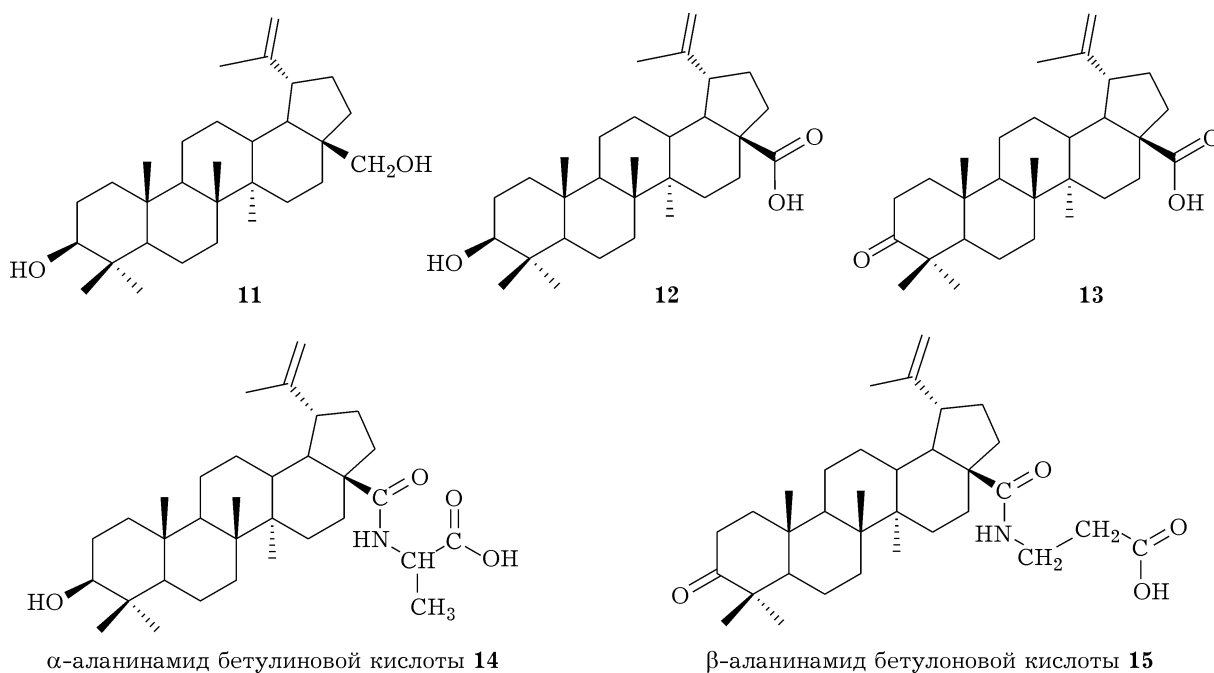


Рис. 6. Бетулин **11**, бетулиновая **12**, бетулоновая **13** кислоты, амиды лупанов.

Протекторные и антипролиферативные свойства бетамида исследовались на мышах и крысах, которые подвергались воздействию цитотоксических препаратов, моделирующих поли- и монотерапию злокачественных опухолей. Противоопухолевая и антиметастатическая активность определялась как в режиме изолированного введения агента, так и в условиях ПХТ программы СНОР, адаптированной для лабораторных животных, с одновременным однократным внутрибрюшинным введением комплекса цитостатических препаратов, в дозах, равных $1/5 LD_{50}$, на мышах линий СВА/Лас и С57ВL/6 с перевиваемыми опухолями (лимфома LS, лимфома RLS и карцинома легких Льюис). В этих же экспериментах определяли возможность потенцирования терапевтического эффекта и снижения органотоксического действия цитостатических препаратов, применяемых при химиотерапии опухолей.

В режиме изолированного введения бетамида применяли внутрижелудочно однократно (доза 500–1000 мг/кг) либо в течение 8 сут (доза 50 мг/кг) после того, как размеры первичного опухолевого узла достигали 1 см^3 . Для оценки антиметастатического эффекта подсчитывали количество метастазных узлов в легких и печени мышей. Установлено, что бетаמיד задерживает рост первичного узла на 20–35 % и снижает количество метастазных узлов на 50–70 % в легких и на 40–50 % в печени [46, 47].

В экспериментах на мышах СВА/Лас с лимфомой RLS, получавших ПХТ СНОР, установлено, что комбинированное применение бетамида снижало количество некротизированных нефроцитов на 77 %, повышало число клеток со слабо выраженной гиалиново-капельной дистрофией на 53 %, уменьшало просвет проксимальных канальцев на 43 % по сравнению с группой ПХТ [48]. В печени этих же мышей при введении агента на фоне ПХТ объемная плотность зон некрозов уменьшалась на 63 %, а зоны с дистрофически измененными гепатоцитами увеличивались на 19 %. При этом степень дистрофии снижалась от гидропической и баллонной до слабо выраженной гиалиново-капельной, повышалась объемная плотность синусоидов (на 28 %), уменьшался внутрипеченочный холестаза, увеличивалось количество гликогена во всех гепатоцитах [49].

В печени мышей С57ВL/6 с карциномой легких Льюис введение бетамида на фоне ПХТ сопровождалось снижением моноцеллюлярных некрозов на 53 %, уменьшением тяжести дистрофии, увеличением объемной плотности синусоидов на 33–40 % и снижением числа метастаз в них по сравнению с введением только ПХТ [50]. В почках этих же мышей при введении тритерпеноида на фоне ПХТ наблюдалось высокое нефропротекторное действие (на 75 %) относительно группы, получавшей только ПХТ [51].

Введение бетамида здоровым крысам Вистар в течение 14 сут в дозе 50 мг/кг на фоне однократного введения цитостатиков по схеме ПХТ СНОР снижало на 75–90 % количество гепатоцитов с дистрофическими изменениями и уменьшало на 35–45 % число некротизированных клеток. В почках амид существенно ослаблял воспалительный эффект цитостатиков, уменьшал на 65–72 % долю нефроцитов проксимальных канальцев с гидропической дистрофией, на 60 % – долю некротических изменений. В тимусе отмечен протекторный эффект бетамида, проявившийся в повышении корково-мозгового индекса и снижении количества телец Гассалья в мозговой части [52–54]. Тимус-протекторное действие амида отмечено на фоне однократного введения циклофосфана здоровым крысам в токсической дозе 125 мг/кг, вызывающего стойкое угнетение кроветворных органов. При комбинированном введении бетамида с доксорубицином наблюдалась тенденция к более быстрому восстановлению массы тимуса. Кроме того, в условиях выраженной глициридемии и дислипидемии, вызванной однократным парентеральным введением крысам доксорубицина (7 мг/кг), тритерпеноид оказывает коррекцию липидного профиля преимущественно за счет снижения уровня липопротеидов низкой плотности [55].

Анализ морфологической картины в развернутой стадии заболевания мышей-опухоленосителей показал, что бетаמיד сохраняет в условиях ПХТ модулирующее влияние на общую численность лейкоцитарных клеток и оказывает стимулирующее влияние на моноциты. Введение агента на фоне ПХТ вызывает значимое повышение количества зрелых лейкоцитов и увеличивает продукцию незре-

лых миелоцитов у животных с карциномой легких Льюис. Следует отметить, что в этих условиях бетамид достоверно увеличивает индексы созревания эритроцитов и гранулоцитов, т. е. оказывает стимулирующее влияние на дифференцировку этих клеточных элементов гемопоэза. Данные индексов созревания клеток костного мозга у мышей с лимфомой RLS, подвергавшихся воздействию цитостатиков и тритерпеноида, подтверждают стимулирующее влияние бетамида на гранулоцитарно-моноцитарный росток крови. Аналогичные, но менее выраженные сдвиги в динамике нейтрофилов и моноцитов крови наблюдали при введении бетамида на фоне однократного введения доксорубина, где также отмечена тенденция к нормализации показателей белой крови, что коррелирует с результатами, полученными в опыте с циклофосфаном. Полученные данные свидетельствуют о гематопротекторном действии бетамида в условиях цитостатических воздействий, при этом коррекционное действие агентов направлено преимущественно на клетки гранулоцитарно-моноцитарного типа, эффекторные в воспалительных и иммунных реакциях.

Под влиянием бетамида наблюдалось резкое ослабление интенсивности пероксидных процессов у мышей с перевиваемыми опухолями, получавших ПХТ. Концентрация в крови вторичного продукта пероксидного окисления – малонового диальдегида – снижалась на 72–75 % при карциноме легких Льюис и на 40 % при лимфоме RLS, по сравнению с животными, получавшими только цитостатики.

В экспериментах на крысах Вистар показано, что бетамид повышал активность цитохромов P450 (P450IIC, P450IIA4, P450IIE1), определяемую по скорости утилизации субстратов (амидомирина, эритромицина и анилина соответственно). Введение амида уже через 6 ч усиливало метаболизм амидопирина, эритромицина и анилина в 1.81, 1.57 и 1.65 раза соответственно. Курсовое введение агента на фоне ПХТ СНОР восстанавливало активность цитохрома P450IIA4 через 6 сут после воздействия и увеличивало активность P450IIE1 на 26.5 и 24.1 % на 7-е и 14-е сут наблюдения соответственно [56].

Гепатопротективные свойства бетамида изучены также в модели хронического токсиче-

ского гепатита, осложненного фиброзом и циррозом. Токсическое повреждение печени моделировали путем 6-недельного внутрижелудочного введения CCl_4 и C_2H_5OH . На этом фоне курсовое введение бетамида в дозе 50 мг/кг полностью предотвращало развитие токсемии и фиброза на всех этапах исследования. При этом в ткани печени наблюдалась стимуляция регенераторно-пластических процессов, купирование холестаза, цитолиза и уменьшение гипоксических повреждений гепатоцитов [57–59].

Изучен эффект длительного (8 недель) введения бетамида в дозе 50 мг/кг крысам на фоне развивающегося экспериментального хронического гастрита, индуцированного внутрижелудочным введением 2 % раствора салицилата натрия в этаноле. Установлено, что бетамид эффективно уменьшает признаки хронического атрофического гастрита: снижает выраженность воспаления, регенерирует ткани слизистой оболочки желудка за счет восстановления пула клеток, секретирующих соляную кислоту, и клеток, секретирующих защитную слизь [60].

В модели экспериментального остеомиелита, индуцированного инокуляцией *Staphylococcus aureus* в ткань большеберцовой кости крыс-самцов, показано, что бетамид оказывает выраженный противовоспалительный эффект. По данным иммуногистохимического и морфологического исследования костной ткани, внутрижелудочное введение бетамида в течение 3 мес. в суточной дозе 100 мг/кг предотвращает генерализацию и хронизацию воспалительного процесса (формирование обширных зон некроза и инфильтрации, остеокластическую резорбцию кости, формирование секвестров) и способствует его разрешению. Установлено, что под влиянием бетамида наблюдается более раннее и выраженное образование рыхлой волокнистой соединительной и грубоволокнистой костной тканей. Бетамид ускоряет наступление фазы функциональной адаптации, способствуя быстрому завершению репаративного эндохондрального остеогенеза и образованию зрелой костной ткани [61].

Представленные результаты свидетельствуют о наличии у бетамида антиоксидантной, гепатопротекторной, противовоспалительной, иммуномодулирующей, противоопухоле-

вой, антиметастатической активности на фоне его низкой токсичности. При введении животным с перевиваемыми опухолями в комбинации с противоопухолевыми препаратами он нормализует количество лейкоцитов крови; ускоряет созревание лейкоцитов в костном мозге; нормализует массу и морфологическую структуру тимуса; уменьшает количество некротических и снижает тяжесть дистрофических поражений в здоровых тканях; усиливает противоопухолевое действие и антиметастатический эффект цитостатической химиотерапии. В нормальных клетках бетамида стимулирует регенеративные процессы, активирует эндцитоз и трансцитоз, усиливает синтетические и обменные процессы, а в опухолевых – вызывает индукцию апоптоза и аутофагоцитоза.

В настоящее время в полной мере проведены доклинические исследования бетамида (исследование острой, субхронической, хронической токсичности, специфической активности, тератогенного, эмбриотоксического и мутагенного действия). Разработана технология получения субстанции бетамида, получены опытно-промышленные партии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растения являются источниками множества структурно разнообразных соединений, с различными, очень интересными механизмами действия и перспективными видами биологической активности. По этой причине им отводится важнейшая роль в непрерывном процессе поиска эффективных и безопасных базовых структур – синтетических платформ. Существующие методы и подходы к разработке новых лекарств основаны на ингибировании или активации ферментов и рецепторов. Растительные метаболиты как составная часть живой системы не только совместимы с ее компонентами, но и обладают способностью к специфическому связыванию с важнейшими системами клетки как, например, ее мембрана, генный аппарат или какие-либо из многочисленных белков или полипептидов. Задачей молекулярного дизайна в этом случае является получение на базе этой структурной платформы набора аналогов и, в ко-

нечном счете, нахождение структуры с оптимальным сочетанием требуемых фармакохимических характеристик.

Реализация возможностей молекулярного дизайна потребует дальнейшей интенсификации работ по полному синтезу фармакологически перспективных веществ и будет стимулировать разработку новых синтетических методов (прежде всего, экологически безопасных). Они должны обеспечивать возможность эффективного получения как целевых структур, так и набора их аналогов. Такой подход относится к высокой технологии органического синтеза с его огромным потенциалом применения в направлении разработки инновационных лекарственных препаратов нового поколения и будет определять дальнейший прогресс в области разработки эффективных лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-53-76001 ЭРА_a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Newman D. J., Crag G. M. // *J. Nat. Prod.* 2016. Vol. 79, No. 3. P. 629–661.
- 2 Shults E. E., Mironov M. E., Kharitonov Yu. V. // *Chem. Nat. Compd.* 2014. Vol. 50, No. 1. P. 2–21.
- 3 Reddy L., Odhav B., Bhoola K. D. // *Pharmacol. Ther.* 2003. Vol. 99, No 1. P. 4–13.
- 4 Soica C. M., Dehelean C. A., Peev C., Aluas M., Zupko I., Kasa Jr. P., Alexa E. // *Nat. Prod. Res.* 2012. Vol. 26. P. 968–974.
- 5 Sun Y. F., Song C. K., Viernstein H., Unger F., Liang Z. S. // *Food Chem.* 2013. Vol. 138. P. 1998–2007.
- 6 Fridén M. E., Jumaah F., Gustavsson C., Enmark M., Fornstedt T., Turner C., Sjöberg P. J. R., Samuelsson J. // *Green Chem.* 2016. Vol. 18. P. 516–523.
- 7 Popov S. A., Sheremet O. P., Kornaukhova L. M., Grazhdannikov A. E., Shults E. E. // *Ind. Crops and Prod.* 2017. Vol. 102. P. 122–132.
- 8 Пат. 2620814 РФ, 2017.
- 9 Popov S. A., Kozlova L. P., Kornaukhova L. M., Shpatov A. V. // *Ind. Crops and Prod.* 2016. Vol. 92. P. 197–200.
- 10 Пат. 2460741 РФ, 2012.
- 11 Пат. 2568881 РФ, 2015.
- 12 Толстикова Т. Г., Сорокина И. В., Долгих М. П., Харитонов Ю. В., Чернов С. В., Шульц Э. Э., Толстиков Г. А. // *Хим.-фарм. журнал.* 2004. Т. 38. С. 13–15.
- 13 Пат. 2436781 РФ, 2011.
- 14 Толстикова Т. Г., Сорокина И. В., Воевода Т. В., Шульц Э. Э., Толстиков Г. А. // *Докл. АН.* 2001. Т. 376. С. 271–273.
- 15 Chae H.-S., Chin Y.-W. // *Immunopharm. & Immunotoxicol.* 2012. Vol. 34. P. 250–252.
- 16 Толстикова Т. Г., Воевода Т. В., Долгих М. П., Сорокина И. В. // *Эксперим. клин. фармакол.* 2002. Т. 65. С. 9–12.
- 17 Миронов М. Е., Харитонов Ю. В., Шульц Э. Э., Шакиров М. М., Багрянская И. Ю., Толстиков Г. А. // *Химия природ. соедин.* 2010. № 2. С. 194–200.

- 18 Харитонов Ю. В., Шульц Э. Э., Шакиров М. М., Толстикова Г. А. // Журн. орган. химии. 2008. Т. 44, № 4. С. 521–528.
- 19 Shults E. E., Velder J., Schmalz H.-G., Chernov S. V., Rybalova T. V., Gatilov Y. V., Henze G., Tolstikov G. A., Prokop A. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2006. Vol. 16, No. 16. P. 4228–4232.
- 20 Ралдугин В. А., Каштанова Н. К., Пентегова В. А. // Химия природ. соед. 1970. № 4. С. 541–542.
- 21 Shpatov A. V., Popov S. A., Salnikova O. I., Kukina T. P., Shmidt E. N., Um B. H. // Chem. Biodiv. 2017. Vol. 14, No. 2. e1600203.
- 22 Asili J., Lambert M., Ziegler H. L., Stark D., Sairafianpour M., Wit M., Asghari G., Ibrahimi I. S., Jaroszewski J. W. // J. Nat. Prod. 2004. Vol. 67. P. 631–637.
- 23 Lee M. K., Yang H., Yoon J. S., Jeong E. J., Kim D. Y., Ha N. R., Sung S. H., Kim Y. C. // Arch. Pharm. Res. 2008. Vol. 31. P. 866–870.
- 24 Han B. H., Yang H. O., Kang Y.-H., Suh D.-Y., Go H. J., Song W.-J., Kim Y. C., Park M. K. // J. Med. Chem. 1998. Vol. 41. P. 2626–2631.
- 25 Koo K. A., Lee M. K., Kim S. H., Jeong E. J., Kim S. Y., Oh T. H., Kim Y. C. // Br. J. Pharmacol. 2007. Vol. 150, No. 1. P. 65–72.
- 26 Katagiry M., Ohtani K., Kasai R., Yamasaki K., Yang C. R., Tanaka O. // Phytochemistry. 1993. Vol. 35, No. 2. P. 439–442.
- 27 Bardai S. E., Morel N., Wibo M., Fabre N., Llabres G., Lyoussi B., Quetin-Leclercq J. // Phytomedicine. 2000. Vol. 7, No. 1. P. 111–115.
- 28 Prisinzano T. E., Rothman R. B. // Chem. Rev. 2008. Vol. 108, No. 5. P. 1732–1743.
- 29 Морозова Е. А., Толстикова Т. Г., Шульц Э. Э., Чернов С. В., Харитонов Ю. В., Миронов М. Е., Толстикова Г. А. // Химия уст. разв. 2010. Т. 18, № 4. С. 489–494.
- 30 Пат. 2534987 РФ, 2014.
- 31 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. 832 с.
- 32 Августиневич Д. Ф., Фомина М. К., Сорокина И. В., Толстикова Т. Г. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2014. Т. 157, № 5. С. 599–603.
- 33 Вечкапова С. О., Запара Т. А., Морозова Е. А., Проскура А. Л., Шульц Э. Э., Толстикова Т. Г., Ратушняк А. С. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2016. Т. 161, № 6. С. 736–739.
- 34 Fenteany G., Zhu S. // Cur. Top. Med. Chem. 2003. Vol. 3, No. 4. P. 593–616.
- 35 Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. Vol. 16, No. 1. P. 55–63.
- 36 Пат. 2691921 РФ, 2018.
- 37 Толстикова Т. Г., Флехтер О. Б., Шульц Э. Э., Балтина Л. А., Толстикова А. Г. // Химия уст. разв. 2005. Т. 13, № 1. С. 1–30.
- 38 Krasutsky P. A. // Nat. Prod. Rep. 2006. Vol. 23, No. 6. P. 919–942.
- 39 Пай З. П. // Химия уст. разв. 2013. Т. 21, № 3. С. 267–277.
- 40 Антимонова А. Н., Петренко Н. И., Шакиров М. М., Покровский М. А., Покровский А. Г., Шульц Э. Э. // Химия природ. соед. 2014. № 6. С. 883–889.
- 41 Ali-Seyed M., Jantan I., Vijayaraghavan K., Bukhari S. N. A. // Chem. Biol. Drug Des. 2016. Vol. 87. P. 517–536.
- 42 Антимонова А. Н., Петренко Н. И., Шакиров М. М., Шульц Э. Э. // Химия природ. соед. 2014. № 2. С. 268–273.
- 43 Антимонова А. Н., Петренко Н. И., Шакиров М. М., Рыбалова Т. В., Фролова Т. С., Шульц Э. Э., Кукина Т. П., Сеницына О. И., Толстикова Г. А. // Химия природ. соед. 2013. № 4. С. 564–570.
- 44 Петренко Н. И., Еланцева Н. В., Петухова В. З., Шакиров М. М., Шульц Э. Э., Толстикова Г. А. // Химия природ. соед. 2002. № 4. С. 276–283.
- 45 Антимонова А. Н., Узенкова Н. В., Петренко Н. И., Шакиров М. М., Шульц Э. Э., Толстикова Г. А. // Химия природ. соед. 2008. № 3. С. 259–264.
- 46 Сорокина И. В., Толстикова Т. Г., Жукова Н. А., Шульц Э. Э., Петренко Н. И., Узенкова Н. В., Попова Н. А. // Бюлл. экспер. биол. мед. 2006. Т. 142, № 7. С. 78–81.
- 47 Сорокина И. В., Жукова Н. А., Толстикова Т. Г., Позднякова С. В., Грек О. Р., Попова Н. А., Каледин В. И., Николин В. П. // Вопр. биол. мед. фарм. хим. 2006. № 1. С. 29–31.
- 48 Жукова Н. А., Семенов Д. Е., Сорокина И. В., Толстикова Т. Г., Позднякова С. В., Грек О. Р. // Сиб. научн. вестник – IX. Новосибирск. 2006. С. 49–51.
- 49 Жукова Н. А., Семенов Д. Е., Сорокина И. В., Толстикова Т. Г., Позднякова С. В., Грек О. Р. // Бюлл. экспер. биол. мед. 2005. Т. 140, № 9. С. 348–351.
- 50 Жукова Н. А., Сорокина И. В., Толстикова Т. Г., Лушникова Е. Л., Непомнящих Л. М., Семенов Д. Е. // Бюлл. экспер. биол. мед. 2010. Т. 150, № 7. С. 108–112.
- 51 Жукова Н. А., Сорокина И. В., Толстикова Т. Г., Долгих М. П., Семенов Д. Е. // Химия уст. разв. 2010. Т. 18, № 4. С. 483–488.
- 52 Сорокина И. В., Толстикова Т. Г., Жукова Н. А., Петренко Н. И., Шульц Э. Э., Грек О. Р., Позднякова С. В., Толстикова Г. А. // Докл. АН. 2004. Т. 399, № 2. С. 274–277.
- 53 Грек О. Р., Позднякова С. В., Надеев А. П., Пронин В. С., Жукова Н. А., Сорокина И. В., Волкова Е. Б., Толстикова Т. Г. // Эксп. и клин. фармакол. 2005. Т. 68, № 6. С. 49–51.
- 54 Позднякова С. В., Грек О. Р., Фунтиков А. С., Жукова Н. А., Сорокина И. В., Толстикова Т. Г. // Журн. экспер. клин. мед. 2006. № 1–2. С. 15–17.
- 55 Клиникова М. Г., Лушникова Е. Л., Колдышева Е. В., Толстикова Т. Г., Сорокина И. В., Южик Е. И., Мжельская М. М. // Бюлл. экспер. биол. мед. 2016. Т. 162, № 8. С. 247–252.
- 56 Позднякова С. В., Грек О. Р., Жоголь Р. А., Шарапов И. В., Шарапов В. И., Сорокина И. В., Толстикова Т. Г. // Вестн. НГУ. Сер.: Биол. клин. мед. 2006. Т. 4, № 3. С. 66–70.
- 57 Толстикова Т. Г., Жукова Н. А., Семенов Д. Е., Бессергенева Е. П., Сорокина И. В., Баев Д. С., Глухов Б. М. // Фундаментальные исследования. 2012. № 5. С. 120–123.
- 58 Бессергенева Е. П., Жукова Н. А., Толстикова Т. Г., Сорокина И. В. // Сиб. онкол. журн. 2011. Т. 48, № 6. С. 41–46.
- 59 Семенов Д. Е., Жукова Н. А., Бессергенева Е. П., Сорокина И. В., Баев Д. С., Глухов Б. М., Непомнящих Г. И., Толстикова Т. Г. // Бюлл. экспер. биол. мед. 2012. Т. 153, № 6. С. 837–840.
- 60 Пат. 2623866 РФ, 2017.
- 61 Пат. 2604124 РФ, 2016.