

ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, АНТИРАДИКАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ И ВЛИЯНИЯ НА ФАГОЦИТОЗ СУХОГО ВОДНОГО ЭКСТРАКТА ШИШЕК СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

© Гуляев Д.К., Гейн О.Н., Белоногова В.Д.

Пермская государственная фармацевтическая академия (ПГФА)

Россия, 614990, Пермский край, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

Шишки сосны обыкновенной являются новым перспективным видом растительного сырья для применения в медицинской практике.

Цель: определение состава фенольных соединений сухого водного экстракта сосны обыкновенной шишек, изучение его токсичности, антирадикальной активности и влияния на фагоцитоз.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись шишки сосны обыкновенной, заготовленные в октябре 2020 года. Из шишек был получен сухой водный экстракт путем экстракции горячей водой. Определение состава фенольных соединений сухого водного экстракта шишек сосны обыкновенной проводили методом ультраэффективной жидкостной хроматографии/МС на хроматографе Waters Acquity с диодно-матричным УФ-детектором и тандемным квадрупольным МС-детектором TQD (Waters). Для определения антирадикальной активности использовали реакцию со стабильным свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH). Острую токсичность шишек сосны экстракта сухого изучали экспресс-методом В.В. Прозоровского на белых нелинейных мышах. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови проводили *in vivo*, модифицированным методом.

Результаты. Проведен анализ состава фенольных соединений исследуемого экстракта. В результате исследования идентифицировано 12 веществ, которые имеют площадь не менее 1% от суммы всех площадей на хроматограмме. В составе экстракта шишек сосны обыкновенной обнаружены процианидины: процианидин В2, процианидин В3, процианидин С1, процианидин D1. Также были обнаружены флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты. Установлено, что сосны обыкновенной шишек экстракт сухой обладает выраженной антирадикальной активностью, близкой к показателям аскорбиновой кислоты. По результатам определения острой токсичности установлено, что ЛД₅₀ исследуемых соединений находится в дозах больших, чем 1260 мг/кг. При изучении влияния экстракта шишек сосны обыкновенной на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови выявлено увеличение фагоцитарного индекса, но не установлено изменения активности общего лейкоцитарного фагоцитоза.

Закключение. Сухой водный экстракт шишек сосны обыкновенной имеет в своем составе биологически активные компоненты фенольной природы и является перспективным для дальнейших исследований фармакологической активности.

Ключевые слова: сосна обыкновенная; шишки; сухой экстракт; фенольные соединения; антирадикальная активность; острая токсичность; фагоцитоз.

Гуляев Дмитрий Константинович – канд. фарм. наук, доцент, доцент кафедры фармакогнозии, ПГФА, г. Пермь. ORCID iD: 0000-0001-9464-1869. E-mail: dkg2014@mail.ru (автор, ответственный за переписку)

Гейн Оксана Николаевна – канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры фармакологии, ПГФА, г. Пермь. ORCID iD: 0000-0002-1327-6685. E-mail: heinon77@mail.ru

Белоногова Валентина Дмитриевна – д-р фарм. наук, доцент, заведующий кафедрой фармакогнозии, ПГФА, г. Пермь. ORCID iD: 0000-0001-5193-3976. E-mail: belonogova@pfa.ru

Наблюдается повышенный интерес населения, фармацевтических работников и врачей к растительным препаратам. Уникальный химический состав, высокая фармакологическая активность, доступность сырья – все это повышает интерес исследователей. В настоящее время в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV издания входят сосны обыкновенной почки и терпентинное масло эфирное очищенное (скипидар очищенный). Остальные части растения, такие как шишки, кора, семена, корни сосны, остаются малоизученными и представляют интерес в качестве потенциально возможного лекарственного растительного сырья.

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) семейства сосновые (*Pinaceae*) является одной из главных лесообразующих пород на территории

Российской Федерации. Древесина сосны – ценное сырье для строительства и деревообрабатывающих предприятий. При заготовке древесины на лесосеках остается огромное количество шишек, которые в дальнейшем не используются.

При исследовании химического состава шишек сосны обыкновенной в качестве биологически активных соединений были выделены эфирные масла, полисахариды, фенолы и полифенолы [1, 2].

Среди фенольных соединений шишек *Pinus koraiensis* были идентифицированы: катехин, катехин-3-о-маннозид, катехин-3-о-глюкозид, скополетин, ванилин, ванилиновая кислота, 3-гидрокси-4-о-β-гликозилбензойная кислота, изорамнетин, метил кверцетин, эпикатехин, лютеолин, флорентин, росманол, мирицетин, кемпферол, дигидрокверцетин, метилкверце-

тинрамнозид, моногаллоил глюкозид, тамариксетин [3-5].

В спиртовом экстракте шишек сосны обыкновенной из фенольных соединений были идентифицированы: кумароилхинная кислота, катехин и эпикатехин, 3-О-глюкозид цианидина, 3-О-глюкозид дельфинидина, 3-О-глюкозид петунидина [6, 7].

Выделенные фенольные соединения шишек сосны при низкой токсичности обладали высокой антиоксидантной и противоопухолевой активностью, проявляли антиаллергический эффект [3-5, 8-12]. Экстракты шишек сосны оказывали влияние и на иммунную систему, в частности, усиливали пролиферативную фазу первичного Т-клеточного иммунного ответа и стимулировали дифференцировку моноклеаров периферической крови в зрелые дендритные клетки [13, 14].

Состав фенольных соединений сухого водного экстракта шишек сосны обыкновенной и их фармакологическая активность требуют более детального изучения для определения перспектив использования в медицине.

Целью настоящей работы явилось определение состава фенольных соединений сухого водного экстракта шишек сосны обыкновенной, изучение его токсичности, антирадикальной активности и влияния на фагоцитоз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлись шишки сосны обыкновенной, заготовленные в октябре 2020 года. Сбор образцов проводили на территории Ильинского района Пермского края в смешанном лесу с преобладанием ели обыкновенной и сосны обыкновенной. Шишки сосны обыкновенной заготавливали с взрослых хорошо развитых деревьев, не пораженных вредителями. Заготовленные шишки высушивали в тени при комнатной температуре в течение месяца.

Экстракт шишек сосны обыкновенной сухой получали по следующей методике: навеску воздушно-сухого сырья помещали в колбу, заливали водой очищенной в соотношении 1:10 и экстрагировали в течение 1,5 часов при температуре 80°C при постоянном перемешивании. После экстракции остаток сырья отделяли от извлечения и проводили отстаивание извлечения в течение двух часов, затем упаривали водное извлечение на ротационном испарителе до густой массы. Упаренный остаток помещали в сушильный шкаф и высушивали при температуре 55°C.

Анализ по определению состава фенольных соединений экстракта проводили методом ультраэффективной жидкостной хроматографии/МС на хроматографе Waters Acquity с диодно-матричным УФ-детектором и tandemным квадрупольным МС-детектором TQD (Waters). Подвижная фаза: смесь вода – ацетонитрил (95:5) с муравьиной кислотой.

Хроматографировали испытуемый раствор и растворы стандартов в следующих условиях: объем пробы 2 мкл и 5 мкл; колонка 0,21×15,0 см AcquityUPLCBENHC18 (1,7 мкм); температура колонки 35°C; скорость потока 0,25 мл/мин; УФ-детекция при 220-250 нм.

Условия МС-детекции в режиме позитивных ионов, параметры детектора: напряжение на капилляре – +3 кВ; напряжение на конусе – 50 В; температура капилляра 450°C; температура источника 120°C; скорость потока осушающего газа 800 л/ч, скорость потока газа в конусе 50 л/ч и сканирование в диапазоне масс от 100 до 1500 ед.

МС-детекция в режиме негативных ионов, параметры детектора: напряжение на капилляре – -3 кВ; напряжение на конусе – -30 В; температура капилляра 350°C; температура источника 120°C; скорость потока осушающего газа 500 л/ч, скорость потока газа в конусе 50 л/ч и сканирование в диапазоне масс от 100 до 1500 ед.

Для определения антирадикальной активности использовали реакцию со стабильным свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH) (Sigma-Aldrich, США, CAS номер: 1898-66-4). К 1 мл разведения экстракта шишек сосны обыкновенной сухого добавляли 3 мл раствора DPPH в 95% спирте этиловом с концентрацией 5 мг/100 мл. В качестве контрольного образца измеряли оптическую плотность 3 мл раствора DPPH в 95% спирте этиловом с концентрацией 5 мг/100 мл и 1 мл воды очищенной. Измерение проводили на спектрофотометре марки СФ 2000 ОКБ «Спектр» (Россия) при 517 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. Далее вычисляли антиоксидантную активность, поглощение радикала по формуле:

$$\% \text{ связывания радикала DPPH} = (A_0 - A_x) / A_0 \times 100,$$

где:

A_0 – оптическая плотность контрольного образца при 517 нм;

A_x – оптическая плотность исследуемого образца при 517 нм.

Затем определяли величину IC₅₀ – концентрацию вещества, способную связать половинную концентрацию радикала DPPH, мкг/мл. Величина IC₅₀ определяется по кривой, получаемой при построении графиков ингибирования в процентах от концентрации вещества.

Острую токсичность сухого экстракта шишек сосны обыкновенной изучали экспресс-

методом В.В. Прозоровского на белых нелинейных мышцах [15]. Исследуемый экстракт вводили перорально в дозах 631, 794, 1000 и 1260 мг/кг. После введения веществ вели наблюдение за животными в течение двух недель, регистрировали их активность, потребление пищи и воды, состояние шерстного покрова, состояние век и др.

Определение фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови проводили модифицированным методом [16]. Эксперимент проводили на белых нелинейных половозрелых крысах массой 180-220 г. Исследуемый экстракт шишек сосны вводили животным перорально в дозе 100 мг/кг. Образцы крови забирали из сосудов хвоста до введения экстракта (контроль), затем через 1 час после введения экстракта. Результаты учитывали микроскопически (Micros MC50, Австрия). Рассчитывали показатели фагоцитарной активности лейкоцитов: процент фагоцитоза (клетки, захватившие объекты фагоцитоза), фагоцитарный индекс (количество объектов фагоцитоза, приходящихся на одну фагоцитирующую клетку) и процент активных фагоцитов (клетки, захватившие два и более объектов фагоцитоза) для общего лейкоцитарного и дифференцированно для нейтрофильного, моноцитарного фагоцитоза.

Все работы с лабораторными животными выполняли в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных.

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ГФ XIV издания ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». Полученные данные обрабатывали методами математической статистики с помощью t-критерия Стьюдента с использованием программы Microsoft Excel. Количественные признаки представлены как $M \pm m$ (среднее арифметическое $\pm$ ошибка среднего). Достоверность отличий между группами считали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании полученных масс-спектров при ионизации в позитивном и негативном режимах были предположены молекулярные ионы (M^+H^+ , M^+Na^+ и MH^-), предложен молекулярный вес компонента, а по фрагментации и УФ-спектрам предположена структура агликона, входящего в состав молекулы. Были собраны данные для пиков, имеющих площадь не менее 1% от суммы всех площадей при 260 нм. Результаты исследования представлены в таблице 1.

В результате исследования идентифицировано 12 веществ, которые имеют площадь не менее 1% от суммы всех площадей на хроматограмме. В составе экстракта шишек сосны обыкновенной обнаружены процианидины: процианидин В2, процианидин В3, процианидин С1, процианидин D1. Эти вещества согласно некоторым исследованиям могут обуславливать проявление множества полезных свойств.

Пероральное введение процианидина D1 в течение 23 дней мышам при моделировании ревматоидного артрита приводит к уменьшению воспалительного отека лап, уменьшению потери хрящевой ткани в сравнении с контрольной группой, а также к снижению уровней антител и провоспалительных цитокинов [17]. Процианидин D1 обладает гипогликемическим действием, улучшает толерантность к глюкозе у мышей. Процианидин D1 способствует активации аутофагии β -клеток поджелудочной железы, что необходимо для поддержания гомеостаза и выживания β -клеток [18].

Процианидин С1 оказывает сенолитическое действие, индуцируя апоптоз стареющих стромальных клеток человека, но без существенного влияния на нестареющие клетки при использовании в соответствующих концентрациях, что говорит о высокой селективности к стареющим клеткам [19].

На фоне асцитной опухоли Эрлиха мышам в дозе 100 мг/кг ежедневно вводили экстракт сосны, богатый проантоцианидинами. При этом наблюдалось уменьшение воспалительного инфильтрата, снижение количества опухолевых клеток, уменьшение уровня перекисного окисления липидов [20].

Следующим этапом являлось исследование антирадикальной активности экстракта. Результаты исследования представлены в таблице 2.

В результате исследования установлено, что сухой экстракт шишек сосны обыкновенной обладает выраженной антирадикальной активностью. Величина IC_{50} для сосны обыкновенной шишек экстракта сухого по связыванию свободного радикала DPPH оказалась близкой к значению вещества сравнения, в качестве которого выступала аскорбиновая кислота.

Для рекомендации полученного экстракта к применению необходимо убедиться в его безопасности. Поэтому следующим этапом являлось исследование острой токсичности сухого экстракта сосны обыкновенной шишек. Результаты изучения острой токсичности представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы, пероральное введение исследуемых концентраций экстракта шишек сосны обыкновенной (631, 794, 1000 и 1260 мг/кг) не приводило к гибели животных. Следовательно, LD_{50} исследуемых соединений находится в дозах больших, чем 1260 мг/кг.

Таблица 1

Table 1

Состав основных фенольных соединений сосны обыкновенной шишек экстракта сухого

The composition of the principal phenolic compounds present in the dry extract of Scotch pine cones.

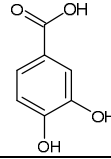
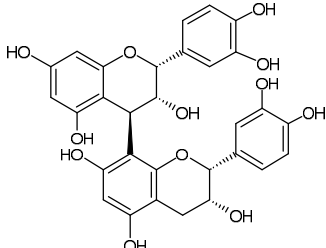
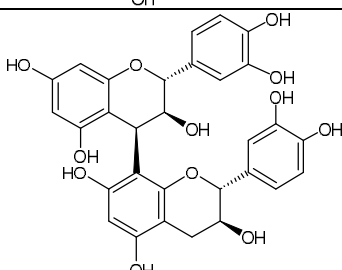
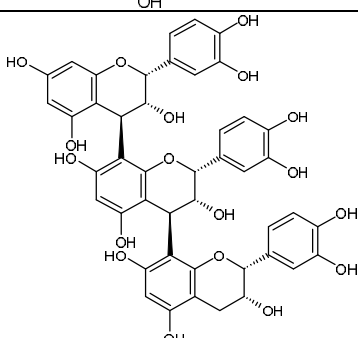
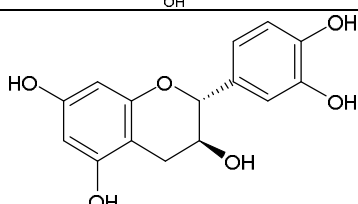
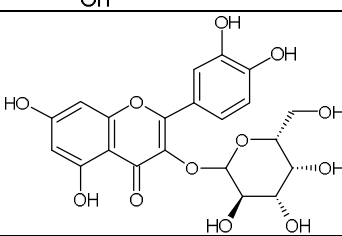
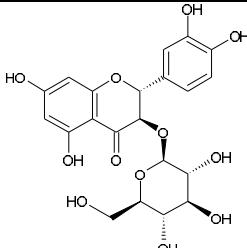
Название вещества Name of the substance	tR	Длина волны Wavelength	Mr	Структурная формула Structural formula
Протокатеховая кислота Protocatechic acid	3.19	260/290	154	
Процианидин В2 Procyanidin B2	3.37	280	578	
Процианидин В3 Procyanidin B3	3.86	280	578	
Процианидин С1 Procyanidin C1	4	280	866	
Катехин Catechin	4.29	280	290	
Гиперозид Hyperoside	8.64	355	464	
Таксифолин-3-О-глюкозид Taxifolin-3-O-glucoside	7.59	290	466	

Таблица 1. Окончание
Table 1. End

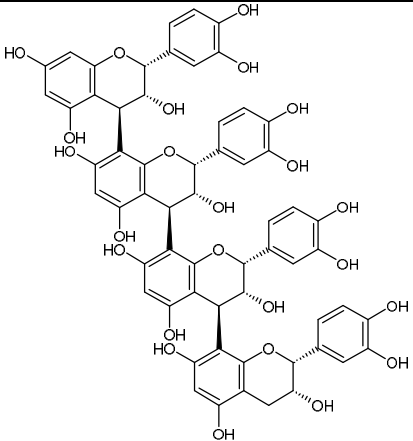
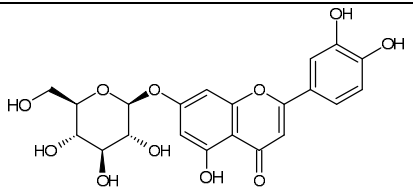
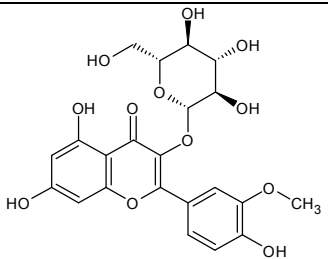
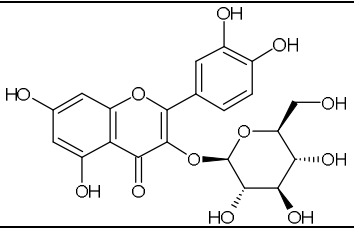
Процианидин D1 Procyanidin D1	4.79	280	1154	
Цинарозид Cinaroside	10.06	348	448	
Изорамнетин-3-О-глюкозид Isoramnetin-3-O-glucoside	10.41	353	478	
Изокверцетин Isoquercetin	11.77	369	464	

Таблица 2
Table 2

Антирадикальная активность сосны обыкновенной шишек экстракта сухого
The antiradical activity of the dry extract of Scotch pine cones

Концентрация, мкг/мл Concentration, mcg/ml	Антирадикальная активность, % связывания DPPH Antiradical activity, % DPPH binding		
	1	2	3
4.0	8.12	9.62	7.18
8.0	16.16	21.16	14.04
12.0	27.07	27.86	30.64
16.0	39.04	39.84	42.57
20.0	48.28	43.61	53.96
40.0	74.13	81.18	85.93
IC ₅₀ мкг/мл IC ₅₀ mcg/ml	24.82	23,49	21,83
Среднее IC ₅₀ мкг/мл Average IC ₅₀ mcg/ml	23.38±1.5		
Аскорбиновая кислота IC ₅₀ мкг/мл Ascorbic acid IC ₅₀ mcg/ml	14.3±0.5		

Таким образом, исследуемый экстракт шишек сосны обыкновенной согласно классификации токсичности лекарственных препаратов по Hodge и Sterner при пероральном введении относится к 4 классу токсичности и является малотоксичным, а в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 к 3 классу токсичности – умеренно токсичные [21].

Полученные результаты сопоставимы с литературными данными по оценке острой токсичности экстрактов и суммы полифенолов шишек сосны обыкновенной [10].

При изучении влияния экстракта шишек сосны обыкновенной на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови выявлено увеличение количества захваченных объектов фагоцитоза, приходящихся на один активный нейтрофил (фагоцитарный индекс), и снижение процента активных моноцитов. Изменения активности общего лейкоцитарного фагоцитоза выявлено не было (табл. 4).

Учитывая вышесказанное, можно отметить, что сухой водный экстракт шишек сосны обыкновенной является перспективным для дальнейших исследований фармакологической активности.

новенной является перспективным для дальнейших исследований фармакологической активности.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРОВ

Гуляев Д.К. – планирование исследования, анализ литературы, сбор данных, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка черновика рукописи; Гейн О.Н. – сбор данных, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка черновика рукописи; Белоногова В.Д. – разработка концепции и дизайна, окончательное утверждение для публикации рукописи.

Таблица 3

Table 3

Острая токсичность сосны обыкновенной шишек экстракта сухого

Acute toxicity of dry extract of Scotch pine cones

Результат Result	Доза, мг/кг Dose, mg/kg			
	631	794	1000	1260
Количество животных Number of animals	2	2	2	2
Выжило Survived	2	2	2	2
Погибло Died	0	0	0	0

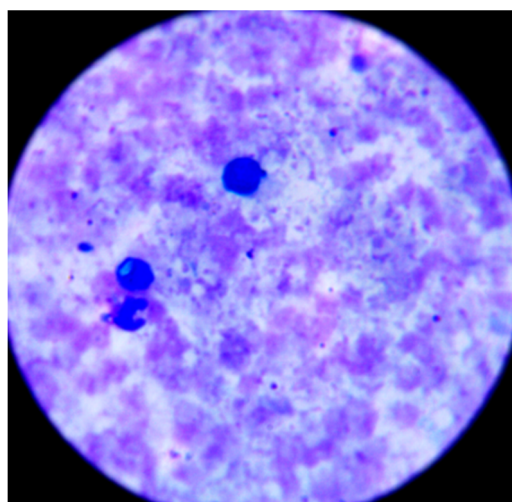


Рис. 1. Микрофотография фагоцитирующих нейтрофилов, окрашенных азур-эозином по Романовскому-Гимзе (увеличение 10×100).

Fig. 1. Micrograph of phagocytic neutrophils stained with azur-eosin according to Romanovsky-Giemse (magnification 10×100).

Таблица 4

Table 4

Влияние сухого водного экстракта шишек сосны обыкновенной на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови

Effect of dry aqueous extract of pine cones on phagocytic activity of peripheral blood leukocytes

Показатель Indication	Контроль Control (n=6)	Экстракт Extract (n=6)
Фагоцитарная активность нейтрофилов Phagocytic activity of neutrophils		
Процент фагоцитоза Percentage of phagocytosis	19.47±1.59	22.59±1.13
Фагоцитарный индекс Phagocytic index	1.22±0.03	1.31±0.02*
Процент активных фагоцитов Percentage of active phagocytes	5.22±0.93	5.39±0.46
Фагоцитарная активность моноцитов Phagocytic activity of monocytes		
Процент фагоцитоза Percentage of phagocytosis	29.73±3.72	28.24±4.02
Фагоцитарный индекс Phagocytic index	1.26±0.11	1.02±0.03
Процент активных фагоцитов Percentage of active phagocytes	6.58±2.19	0.79±0.93*
Фагоцитарная активность общей популяции лейкоцитов Phagocytic activity of the general leukocyte population		
Процент фагоцитоза Percentage of phagocytosis	25.36±2.68	22.92±1.18
Фагоцитарный индекс Phagocytic index	1.25±0.04	1.29±0.02
Процент активных фагоцитов Percentage of active phagocytes	5.48±0.95	5.13±0.46

Примечание: результаты представлены в виде средней и ее стандартной ошибки ($M \pm m$); * – $p < 0,05$ по отношению к контролю, n – количество животных.

Note: the results are presented in the form of the mean and its standard error ($M \pm m$); * – $p < 0.05$ relative to the control, n – number of animals.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Xu R.B., Yang X., Wang J., Zhao H.T., Lu W.H., Cui J., Cheng C.L., Zou P., et al. Chemical composition and antioxidant activities of three polysaccharide fractions from pine cones. *Int J Mol Sci.* 2012;13(11):14262–14277. DOI: 10.3390/ijms131114262.
- Mitic Z.S., Jovanovic B., Jovanovic S.C., Mihajilov-Krstev T., Stojanovic-Radic, Z.Z., Cvetkovic V.J., Stojanovic G.S. Comparative study of the essential oils of four Pinus species: Chemical composition, antimicrobial and insect larvicidal activity. *Industrial Crops and Products.* 2018;111:55–62. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.10.004.
- Wang L., Li X., Wang H. Physicochemical properties, bioaccessibility and antioxidant activity of the polyphenols from pine cones of Pinus koraiensis. *Int J Biol Macromol.* 2019;126:385–391. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.145.
- Yi J., Wang Z., Bai H., Yu X., Jing J., Zuo L. Optimization of Purification, Identification and Evaluation of the in Vitro Antitumor Activity of Polyphenols from Pinus Koraiensis Pinecones. *Molecules.* 2015;20(6):10450–10467. DOI: 10.3390/molecules200610450.
- Diao Y., Chen B., Wei L., Wang Z. Polyphenols (S3) Isolated from Cone Scales of Pinus koraiensis Alleviate Decreased Bone Formation in Rat under Simulated Microgravity. *Sci Rep.* 2018;8(1):12719. DOI: 10.1038/s41598-018-30992-8.
- Latos-Brozio M., Masek A., Chrzescijanska E., Podsek A., Kajszyzak D. Characteristics of the Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Cone Extracts from Conifers Determined Using Electrochemical and Spectrophotometric Methods. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(11):1723. DOI: 10.3390/antiox10111723.
- Беленовская Л.М., Лесиовская Е.Е. Растительные ресурсы России: Компонентный состав и биологическая активность растений. Том 7. СПб.: Товарищество

- ришество научных изданий КМК; 2016. 333 с. [Belenovskaya L.M., Lesiovskaya E.E. *Plant resources of Russia: Component composition and biological activity of plants*. Volume 7. St. Petersburg: Tovari-shchestvo nauchnyh izdanij KMK; 2016. 333 p. (in Russ.)]
8. Lee A.R., Roh S.S., Lee E.S., Min Y.H. Antioxidant and antimelanogenic activity of the methanol extract of pine cone. *Asian Journal of Beauty and Cosmetology*. 2016;14(3):301–308. DOI: 10.20402/ajbc.2016.0055.
9. Burrows M., Assundani D., Celis E., Tufaro F., Tanaka A., Bradley W.G. Oral administration of PPC enhances antigen-specific CD8+ T cell responses while reducing IgE levels in sensitized mice. *BMC Complement Altern Med*. 2009;9:49. DOI: 10.1186/1472-6882-9-49.
10. Yoshida H.K., Osamu T., Shiro W., Tanaka A., Kobayshai Y., Tatsuo S. Acute toxicity studies of pine cone extract substances (polyphenylpropenoid-polysaccharides complex, PPC) in mice. *Journal of New Remedies & Clinics*. 50:583–596.
11. Sakagami H., Asano K., Yoshida T., Kawazoe Y. Organ distribution and toxicity of lignin. *In Vivo*. 1999;13(1):41–44.
12. Apetrei C.L., Boz I., Cenuşa E., Ionescu A., Miron A. Pini cembrae coni: histo-anatomical and chemical studies, assessment of antioxidant activity. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2012;116(2):635–41.
13. Bradley W.G., Holm K.N., Tanaka A. An orally active immune adjuvant prepared from cones of *Pinus sylvestris*, enhances the proliferative phase of a primary T cell response. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:163. DOI: 10.1186/1472-6882-14-163.
14. Bradley W.G., Widen R.H., Weiser A.M., Powers J.J., Fountain L.B., Punjwani P., Lofgren S.M., Hadzic T., et al. The novel differentiation of human blood mononuclear cells into CD1a-negative dendritic cells is stimulated in the absence of exogenous cytokines by an extract prepared from pinecones. *Int Immunopharmacol*. 2003;3(2):209–223. DOI: 10.1016/S1567-5769(02)00267-9.
15. Проzorовский В.В., Проzorовская В.М. Экспресс метод определения средней летальной дозы. *Фармакология и токсикология*. 1978;(4):497–502. [Prozorovskiy V.V., Prozorovskaya V.M. Express method for determining the average lethal dose. *Farmakologiya i toksikologiya*. 1978;(4):497–502 (in Russ.)].
16. Шилов Ю.И., Владыкина В.П., Атнагузина А.Т. Некоторые методические подходы к оценке показателей общего и дифференцированного фагоцитоза лейкоцитов периферической крови. Характеристика различий у здоровых людей. *Пермский медицинский журнал*. 1998;(2):3–9. [Shilov Yu.I., Vladykina V.P., Atnaguzina A.T. Some methodological approaches to the assessment of indicators of general and differentiated phagocytosis of peripheral blood leukocytes. Characteristics of differences in healthy people. *Perm Medical Journal*. 1998;(2):3–9 (in Russ.)].
17. Shi C., Zhang H., Wang X., Jin B., Jia Q., Li Y., Yang Y. Cinnamtannin D1 attenuates autoimmune arthritis by regulating the balance of Th17 and treg cells through inhibition of aryl hydrocarbon receptor expression. *Pharmacol Res*. 2020;151:104513. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104513.
18. Wang X.Y., Zhu B.R., Jia Q., Li Y.M., Wang T., Wang H.Y. Cinnamtannin D1 Protects Pancreatic β -Cells from Glucolipotoxicity Induced Apoptosis by Enhancement of Autophagy In Vitro and In Vivo. *J Agric Food Chem*. 2020;68(45):12617–12630. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c04898.
19. Xu Q., Fu Q., Li Z., Liu H., Wang Y., Lin X., He R., Zhang X., et al. The flavonoid procyanidin C1 has senotherapeutic activity and increases lifespan in mice. *Nat Metab*. 2021 Dec;3(12):1706–1726. DOI: 10.1038/s42255-021-00491-8.
20. Barbosa David S.M., Souza Fernandes F., Dos Santos Silva Ferreira J.B., Ludtke D.D., Martins D.F., Bobinski F., Gaspar Carvalho da Silva G.B., et al. Dietary supplementation with Procyanidin-rich *Pinus pinaster* extract is associated with attenuated ehrlich tumor development in mice. *Nutr Res*. 2019;62:41–50. DOI: 10.1016/j.nutres.2018.11.005.
21. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал*. 2003;37(3):32–34. EDN: SVZNUR. [Berezovskaya I.V. Classification of substances with respect to acute toxicity for parenteral administration. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2003;37(3):139–141. DOI: 10.1023/A:1024586630954. EDN: LHZPND.]

Поступила в редакцию 25.12.2022
Подписана в печать 25.05.2024

Для цитирования: Гуляев Д.К., Гейн О.Н., Белоногова В.Д. Изучение состава фенольных соединений, антирадикальной активности и влияния на фагоцитоз сухого водного экстракта шишек сосны обыкновенной. *Человек и его здоровье*. 2024;27(1): 39–47. DOI: 10.21626/vestnik/2024-1/05. EDN: MZSWHS.

INVESTIGATION OF THE COMPOSITION OF PHENOLIC COMPOUNDS, THE ANTIRADICAL ACTIVITY AND THE EFFECT ON PHAGOCYTOSIS OF PINE CONES DRY AQUEOUS EXTRACT

© Gulyaev D.K., Gein O.N., Belonogova V.D.

Perm State Pharmaceutical Academy (PSPA)

2, Polevaya str., Perm, Perm Krai, 614990, Russian Federation

Pine cone is a new promising type of plant raw material for using in a medical practice.

Objective: determination of the phenolic compounds composition of pine cones dry aqueous extract, research of its toxicity, antiradical activity and effect on phagocytosis.

Materials and methods. The research object was a collection of pine cones gathered in October 2020. A dry aqueous extract was obtained from the cones by extraction with hot water. The phenolic compounds composition of the pine cones dry aqueous extract was determined by ultra-efficient liquid chromatography/MS on a Waters Acquisition chromatograph with a diode-matrix UV detector and a tandem quadrupole MC detector TQD (Waters). To determine the antiradical activity, a reaction with a stable free radical, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), was used. The acute toxicity of the pine cones dry extract was researched by the V.V. Prozorovsky express method on white non-linear mice. The phagocytic activity of peripheral blood leukocytes was determined in vivo by a modified method.

Results. The phenolic compounds composition of the extract was analysed. The research identified 12 substances present in the extract, representing at least 1% of the total area on the chromatogram. The following procyanidins were found in the pine cones extract: procyanidin B2, procyanidin B3, procyanidin C1, procyanidin D1. Additionally, flavonoids and phenolic carboxylic acids were identified. The pine cones dry extract demonstrated pronounced antiradical activity, comparable to that of ascorbic acid. The acute toxicity determination revealed that the LD50 of the researched compounds is in doses greater than 1260 mg/kg. Upon examination of the effect of pine cone extract on the phagocytic activity of peripheral blood leukocytes, an increase in the phagocytic index was observed, yet no change was noted in the activity of total leukocyte phagocytosis.

Conclusion. The dry aqueous extract of pine cones contains biologically active components of phenolic nature, which suggests that further research into its pharmacological activity may be promising.

Keywords: Scotch pine; cones; dry extract; antiradical activity; acute toxicity; effect on phagocytosis.

Gulyaev Dmitry K. – Cand. Sci. (Pharm.), Associate Professor of the Department of pharmacognosy, PSPA, Perm, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-9464-1869. E-mail: dkg2014@mail.ru (corresponding author)

Gein Oksana N. – Cand. Sci. (Bio.), Associate Professor of the Department of Pharmacology, PSPA, Perm, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-1327-6685. E-mail: heinon77@mail.ru

Belonogova Valentina D. – Dr. Sci. (Pharm.), Associate Professor, Head of the Department of Pharmacognosy, , PSPA, Perm, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0001-5193-3976. E-mail: belonogova@pfa.ru

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

AUTHORS CONTRIBUTION

Gulyaev D.K. – research planning, literature analysis, data collection, analysis and interpretation of the obtained data, preparation of a draft manuscript; Gein O.N. – data collection, analysis and interpretation of the obtained data, preparation of a draft manuscript; Belonogova V.D. – concept and design development, final approval for the publication of the manuscript.

Received 25.12.2022

Accepted 25.05.2024

For citation: Gulyaev D.K., Gein O.N., Belonogova V.D. Investigation of the composition of phenolic compounds, the antiradical activity and the effect on phagocytosis of pine cones dry aqueous extract. *Humans and their health.* 2024;27(1):39–47. DOI: 10.21626/vestnik/2024-1/05. END: MZSWHS.