МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
им. И.К. Ахунбаева

На правах рукописи

УДК 615:615.014:615.4

ИСМАИЛОВ ИСАБЕК ЗАЙЛИДИНОВИЧ

НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГОТОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ФИТОПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ НАДЗЕМНЫХ ЧАСТЕЙ PADUS GRAYANAE MAXIM, ИЗУЧЕНИЕ ИХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология
14.04.01 – технология получения лекарств

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Научный консультант:
член-корр. НАН КР.,
д.м.н., проф. Зурдинов А.З.

Бишкек – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений ……..			**5**
ВВЕДЕНИЕ…….			**8**
ГЛАВА 1	**Разработка и применение иммуномодуляторов в современной медицине: проблемы и перспективы (обзор литературы)**		**16**
	1.1.	Место и роль иммуномодулирующих средств в клинической медицине…….	16
	1.2.	Характеристика основных групп иммуномодулирующих средств…….	23
	1.3	Иммуномодулирующие средства растительного происхождения: эффективность, безопасность, использование……..	33
ГЛАВА 2	**Материал и методы исследования**…….....		**43**
ГЛАВА 3	**Анализ фармацевтического рынка иммуномодуляторов в Кыргызской Республике**……		**53**
ГЛАВА 4	**Разработка технологии получения сухого экстракта Padus Grayanae Maxim и его стандартизация…….**		**65**
	4.1.	Получение сухого экстракта Padus Grayanae Maxim……	65
	4.2.	Изучение биологически активных веществ сухого экстракта Padus Grayanae Maxim	70
	4.2.1	Определение содержания флавоноидов и аскорбиновой кислоты в экстракте Padus Grayanae Maxim ……..	70
	4.2.2.	Определение содержания хлорогеновой и кофеиновой кислот в экстракте Padus Grayanae Maxim……	74

	4.2.3.	Определение содержания моно-, олиго- и полисахаридов в сухом экстракте Padus Grayanae Maxim.....	77
	4.2.4.	Определение содержания химических элементов в фитоэкстракте Padus Grayana Maxim ……..	81
	4.3.	Микробиологическая чистота, как показатель качества сухого экстракта из надземных частей Padus Graynae Maxim.....	83
	4.4.	Стандартизация полученного сухого экстракта (субстанции) по регламентируемым показателям ……	89
ГЛАВА 5	**Фармако-токсикологическая характеристика сухого экстракта Padus Grayanae Maxim**……..		95
	5.1.	Изучение острой токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim ……..	96
	5.2.	Изучение хронической токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim ……	103
	5.3.	Изучение мутагенных свойств сухого экстракта Padus Grayanae Maxim……..	123
ГЛАВА 6	**Изучение фармакологической активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim ……..**		128
	6.1.	Изучение эффективности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на экспериментальной модели стафилококковой инфекции у мышей……	128
	6.2.	Изучение противовоспалительной активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim in vitro……	139
	6.3.	Изучение противоопухолевой активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim in vitro……	144
	6.4.	Изучение антиоксидантной активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim in vitro ……..	151

ГЛАВА 7	**Разработка твердых лекарственных форм сухого экстракта Padus Grayanae Maxim и их стандартизация**		157
	7.1.	Технологическая разработка и стандартизация таблеток из сухого экстракта Padus Grayanae Maxim……	157
	7.2.	Технологическая разработка и стандартизация капсулированной формы сухого экстракта Padus Grayanae Maxim…….	168
	7.3.	Технология получения и стандартизация гранул сухого экстракта из надземных частей Padus Grayanae Maxim для приготовления раствора для приема внутрь (саше)……**……...**	175
ВЫВОДЫ……			185
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ……..			187
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ……			188
ПРИЛОЖЕНИЕ			223

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АТХ	-	анатомо-терапевтико-химическая классификация
БАВ	-	биологически активные вещества
БАД	-	биологически активная добавка к пище
ВОЗ	-	Всемирная организация здравоохранения
ВФС	-	Временная фармакопейная статья
ВЭЖХ		Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЛФ	-	готовые лекарственные формы
ГФ	-	Государственная фармакопея
ДЛО И МТ МЗ КР		Департамент лекарственного обеспечения и медицинской техники Министерства здравоохранения Кыргызской Республики
ИД	-	иммунодефицит
ИДС	-	иммунодефицитные состояния
ИМ	-	иммуномодулятор
КР	-	Кыргызская Республика
ЛП	-	лекарственный препарат
ЛРС	-	лекарственное растительное сырье
ЛС	-	лекарственное средство
МНН	-	международное непатентованное наименование
НАН КР	-	Национальная академия наук Кыргызской Республики
НД	-	нормативная документация
ОПР	-	опытно-промышленный регламент
ОРИ	-	острые респираторные инфекции
ПОЛ	-	перекисное окисление липидов
ПЭ	-	побочный эффект

РКИ	-	рандомизированное контролируемое иссдедование
РФ	-	Российская Федерация
СОЭ	-	скорость оседания эритроцитов
СФ	-	спектрофометр
СРО	-	свободно-радикальное окисление
ТИ	-	технологическая инструкция
ТУ	-	технические условия
ФСП	-	Фармакопейная статья предприятия
ХОБЛ	-	хроническая обструктивная болезнь легких
ИЛ/IL	-	интерлейкин
ИФН/ IFN	-	интерферон
КОЕ	-	колониеобразующие единицы
конА	-	конкаванавалин А
$ЛД_{50}$	-	средняя смертельная доза
МНК	-	мононуклеарные клетки
МПД	-	максимально переносимая доза
МТТ	-	3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид
ФБС	-	фетальная бычья сыворотка
ФНО/ TNF	-	фактор некроза опухоли
$ЦТК_{50}$	-	цитотоксическая концентрация, приводящая к 50 % гибели клеток
A549	-	рак лёгких человека
AAS	-	раствор антибиотика-антимикотика
AGS	-	аденокарацинома желудка
ATCC	-	Американская коллекции типированных культур (American Type Culture Collection)
DMSO	-	диметилсульфоксид
DPPH	-	2,2-дифенил-1-пикрилгидразил

HCT15	-	рак толстой кишки человека
HeLa	-	цервикальная аденокарцинома человека
HepG2	-	гепатоцеллюлярная карцинома человека
LPS	-	липополисахарид
MCF7	-	рак молочной железы
MDCK	-	эпителиальные клетки почки собаки
MiaPaCa2	-	панкреатическая карцинома человека
RD	-	рабдомиосаркома мышей
SIRS	-	синдром системного воспалительного ответа
SOFA	-	оценка органной недостаточности при сепсисе
ЕАЭС	-	Евро-Азиатский Экономический Союз
ОсОО	-	Общество с ограниченной ответственностью

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации

Растительный мир был и остается одним из основных источников получения лекарственных средств. В настоящее время не только в развивающихся, но и в промышленно развитых странах, таких как Германия, Италия, США, прослеживается устойчивая тенденция к увеличению потребительского спроса на лекарственные растительные средства [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Еще в 1978 г Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) создала рабочую группу по Программе традиционной медицины (Traditional Medicine Program). Затем была обнародована Стратегия по традиционной медицине на 2002–2005 гг. В 2014 году была представлена обновленная редакция Стратегии ВОЗ по традиционной медицине на 2014–2023гг [8, 9]. В этих документах ВОЗ отмечается важность гербальной медицины и дополнительной (альтернативной) медицины, а также подтверждается тенденция к росту спроса среди населения на препараты растительного происхождения.

Поиск и разработка новых эффективных ЛС иммуномодулирующего действия обусловлены широким распространением заболеваний, связанных с иммунодефицитными состояниями, а также с неуклонным ростом инфекционно-воспалительных заболеваний, склонных к хроническому и рецидивирующему течению на фоне низкой эффективности проводимой базовой терапии, злокачественных новообразований, вирусных инфекций, обуславливающих высокий уровень заболеваемости, смертности и инвалидности [10, 11].

Общепризнано, что важным аспектом в предупреждении рецидивов и лечении заболеваний, а также в профилактике иммунодефицитов, является сочетание базовой терапии с рациональной иммунокоррекцией [12, 13, 14].

Как следует из данных литературы, с целью коррекции иммунодефицитных состояний используются ЛС как синтетического, так и природного происхождения.

Особый интерес представляют ЛС растительного происхождения, выгодно отличающиеся от синтетических лекарств широким спектром терапевтического действия, малой токсичностью и связанной с этим возможностью длительного применения. Исследования последних лет показывают, что своими целебными свойствами лекарственные растения обязаны оптимальному соотношению и гармоничному взаимодействию комплекса содержащихся в них биологически активных веществ, имеющих эволюционно и генетически большее сродство с организмом человека, чем синтетические ЛС. Весьма эффективными при профилактическом и терапевтическом использовании являются многокомпонентные препараты, содержащие биологически активные вещества, относящиеся к различным классам химических соединений, оказывающих комплексное воздействие на основные звенья патологического процесса [15, 16].

При разработке новых фитопрепаратов предпочтение отдается наиболее эффективным, безопасным и удобным в применении лекарственным формам.

Лекарственные препараты, изготовленные на основе сухих растительных экстрактов, вполне отвечают данным критериям. К преимуществам их использования относятся удобство применения, устойчивость при хранении, возможность более точного дозирования.

В настоящее время перспективным направлением в области создания фитопрепаратов является производство сухих экстрактов. Сухие экстракты являются наиболее рациональным типом экстрактов. Они удобны в использовании, имеют минимальную массу, содержат балластных веществ

меньше, чем жидкие экстракты. Сухие экстракты применяются в виде растворимых чаев, а также служат основой для получения различных твердых лекарственных форм, содержащих поливалентный набор биологически активных веществ, полученных из растительного лекарственного сырья в их естественной композиции [17, 18].

Всестороннее изучение и рациональное использование препаратов получаемых из лекарственного растительного сырья (ЛРС) является одним из важнейших направлений развития фармакологии и фармацевтической промышленности, в особенности, в нашей стране, т.к. Кыргызская Республика обладает богатейшими растительными ресурсами.

Таким образом, создание новых лекарственных форм отечественных фитопрепаратов для перорального приема с иммуномодулирующим действием и экономической доступностью, стабильных при хранении является актуальной проблемой фармации и фармакологии.

Связь темы диссертации с приоритетными научными направлениями, основными научно-исследовательскими работами

Работа выполнена в рамках темы научно-исследовательской работы кафедры базисной и клинической фармакологии КГМА им. И.К. Ахунбаева «Разработка новых фармакологических средств природного и синтетического происхождения и изучение использования лекарственных препаратов в практической медицине», № государственной регистрации 0004828.

Цель исследования: обоснование и разработка технологии получения готовых лекарственных форм фитопрепарата Padus Grayanae Maxim и исследование их фармацевтических и фармакологических свойств.

Задачи исследования

1. Провести анализ фармацевтического рынка иммуномодулирующих средств в Кыргызской Республике по фармакотерапевтическим группам, лекарственным формам, ценовым характеристикам и фирмам-производителям с целью обоснования перспективности создания

иммуномодуляторов на основе сухого экстракта Padus Grayanae Maxim из местного растительного сырья.

2. Разработать технологические параметры получения сухого экстракта Padus Grayanae Maxim и провести стандартизацию полученного сухого экстракта (субстанции) согласно фармакопейным требованиям.
3. Изучить физические, фитохимические и технологические свойства сухого экстракта из надземных частей Padus Grayanae Maxim. Разработать и валидировать методику определения комплекса БАВ в готовой лекарственной форме.
4. Провести доклинические исследования спектра фармакологической активности, иммунотропных свойств и токсикологических характеристик сухого экстракта Padus Grayanae Maxim.
5. Теоретически и экспериментально обосновать оптимальный состав и разработать рациональную технологию получения твердых лекарственных форм с сухим экстрактом Padus Grayanae Maxim для перорального приема в форме саше, капсул, таблеток.
6. Провести исследования по установлению основных показателей качества разработанных лекарственных форм для их стандартизации, обосновать условия хранения и срок годности.
7. Разработать необходимую нормативную документацию на субстанцию и готовые лекарственные формы на основе сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в виде проектов ФСП, опытно-промышленных регламентов на производство.

Научная новизна полученных результатов. На основе проведенного анализа фармацевтического рынка иммуномодулирующих средств в КР обоснована актуальность создания и изучения иммуномодуляторов природного происхождения из местного растительного сырья.

Впервые теоретически обоснован и экспериментально подтвержден способ получения сухого экстракта Padus Grayanae Maxim, включающий в себя основные стадии: экстрагирование, упаривание, очистку, сушку и

стабилизацию. Разработаны показатели качества полученного фитоэкстракта, необходимые для его стандартизации согласно фармакопейным требованиям.

Впервые получены данные о фармако-токсикологических свойствах сухого экстракта Padus Grayanae Maxim: изучены острая и хроническая токсичность, мутагенность, иммуномодулирующее и противовоспалительное действие, антиоксидантная и противоопухолевая активность.

Впервые теоретически и экспериментально обоснованы схемы рациональной рецептуры и технологии готовых лекарственных форм фитопрепаратов из сухого экстракта Padus Grayanae Maxim для перорального приема – таблетки, капсулы и саше, экономически доступных, удобных в применении и стабильных при хранении. Разработаны методики оценки качества ГЛФ фитопрепарата из сухого экстракта Padus Grayanae Maxim, проведена их стандартизация по основным действующим веществам, изучена стабильность при хранении.

Научная новизна работы подтверждена 2 Патентами на изобретение: Патент № 20170100.1 «Способы получения сухого экстракта из надземных частей Padus Grayanae Maxim» и Патент № 20170104.1 «Лекарственное средство в виде таблеток на основе сухого экстракта из надземных частей Padus Grayanae Maxim» (Приложение 1).

Практическая значимость полученных результатов. В результате проведенных исследований разработаны технология и методы стандартизации опытно-промышленного производства твердых лекарственных форм фитопрепарата из сухого экстракта Padus Grayanae Maxim (Приложение 2. Проект Опытно-промышленного регламента на готовые лекарственные формы из сухого экстракта Padus Grayana Maxim).

По результатам исследований разработаны проекты фармакопейной статьи предприятия (ФСП) на готовые лекарственные формы фитопрепарата Padus Grayanae Maxim и получены опытные серии разработанных готовых лекарственных форм (Приложение 3).

Разработанные оптимальные ГЛФ фитопрепарата из надземных частей Padus Grayanae Maxim с использованием современных технологий позволят расширить арсенал иммунотропных фитопрепаратов для перорального применения, будут способствовать освоению производства лекарственных средств на основе местного лекарственного растительного сырья и развитию отечественной фармацевтической промышленности.

Внедрение результатов исследований (экономическая значимость полученных результатов). Разработанная технология и методы стандартизации опытно-промышленного производства твердых лекарственных форм фитопрепарата Padus Grayanae Maxim внедрены в производственный процесс ОсОО «Биовит», Кыргызская Республика (приложение 4).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Отечественный рынок фармацевтических препаратов недостаточно насыщен препаратами-иммуномодуляторами: в аптеках имеется в продаже только около 50% от зарегистрированных в Кыргызстане препаратов из группы иммуномодуляторов, чем и обусловлена необходимость в разработке и внедрении препаратов из группы иммуномодуляторов.
2. Разработаны технологические параметры эффективного и экологически безопасного получения сухого экстракта из надземных частей Padus Grayanae maxim, установлен качественный и количественный состав БАВ и регламентируемые показатели для его стандартизации согласно фармакопейным требованиям.
3. Изучение острой токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на мышах и крысах при внутрижелудочном пути введения позволяет отнести изучаемый фитоэкстракт к 5 классу токсичности по международной системе классификации токсичности веществ (GHS).
4. Изучение профиля безопасности фитоэкстракта Padus Grayanae Maxim в дозах 300, 600 и 900 мг/кг в течение 30 и 90 суток не выявило

отрицательного влияния изучаемого фитоэкстракта на общее состояние, массу тела, показатели периферической крови, биохимические параметры сыворотки крови и морфологическую картину внутренних органов экспериментальных животных.

5. Доклиническое изучение фармакологической активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim показало, что изучаемый фитоэкстракт обладает противовоспалительным, иммуномодулирующим, противоопухолевым и антиоксидантным действиями.
6. Разработаны оптимальный состав и технология производства готовых твердых лекарственных форм из сухого экстракта Padus Grayanae Maxim, основные показатели качества для их стандартизации.

Личный вклад соискателя: непосредственное участие автора во всех этапах выполнения диссертационной работы: разработке плана и дизайна исследования, анализе и обобщении данных научной литературы по теме исследования, сборе и обработке фактического материала, анализе, обобщении интерпретации данных собственных исследований, написании статьей и окончательном оформлении диссертационной работы.

Апробация результатов исследования. Результаты исследований доложены и обсуждены на: XVII Международной научно - практической конференции молодых ученых и студентов (Бишкек, 2012); IV Международной научная конференции молодых ученых и студентов «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» в Южно-Казахстанской фармацевтической академии (Шымкент, 2016); IV Московский международный салон образовании (Москва 2017); II международная научно-практическая конференция фармакологов (Рига 2017); Международная научно-практическая конференция «Роль современной фармакологии, клинической фармакологии и фармации в охране здоровья населения», посвящённая 90-летию почетного Академика НАН КР, профессора М.Т. Нанаевой (Бишкек 2017).

Полнота отражения результатов диссертации в публикациях. Основные положения диссертации отражены в 18 научных статьях, в изданиях, рекомендованных ВАК КР, 2 Патентах на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает введение, литературный обзор, главу «Материалы и методы исследования», 5 глав с описанием результатов собственных исследований, выводы, практические рекомендации, список литературы, включающий 303 использованных библиографических источников, из них 183 отечественных и стран ближнего зарубежья и 120 – дальнего зарубежья; 4 приложений.

Диссертационная работа изложена на 413 страницах текста, выполненного на компьютере, шрифтом Times New Roman 14 через 1,5 межстрочных интервала, иллюстрирована 38 таблицами, 28 рисунками, 28 микрофотографиями.

ГЛАВА 1
РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ В СОВРЕМЕННОЙ МЕДИЦИНЕ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ (обзор литературы)

1.1. Место и роль иммуномодулирующих средств в клинической медицине

Последние достижения клинической иммунологии убедительно показали, что развитие многих заболеваний в той или иной степени связано с иммунными нарушениями в организме человека. Клиницисты зачастую отмечают изменения классического течения многих заболеваний, рост числа инфекционных болезней, вызываемых условно-патогенными возбудителями, отсутствие достаточной клинической эффективности в ответ на проводимую фармакотерапию.

Усугубляют ситуацию и бесконтрольное применение ЛП и БАДов в процессе самолечения, несоблюдение пациентами рекомендаций врача по приему ЛС, имеющиеся серьезные экологические проблемы, особенно остро проявляющиеся в условиях мегаполисов др. [19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28].

Перечисленные факторы и способствуют развитию иммунной недостаточности, развитие которой не связанно с генетическими дефектами. Для ее описания используют различную терминологию: вторичная иммунная недостаточность, дисфункция иммунной системы, транзиторный вторичный иммунодефицит, вторичный иммунодефицит с изменениями местного иммунитета и др. [29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40].

В большей степени развитие нарушений иммунной системы присуще детям и пожилым людям, что объясняется наличием нескольких критических возрастных периодов иммуногенеза: до 28 дней жизни, 3–6 месяца жизни, 2-й год, 6–7 лет жизни, подростковый возраст, старение, в течение которых чаще всего может наблюдаться неадекватный или парадоксальный иммунный ответ, с нетипичным течением острых и хронических инфекционных воспалительных процессов, тропидностью и неэффективностью даже адекватно назначенной терапии [41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51].

У взрослых пациентов снижение иммунитета, не связанное с генетическими дефектами, обусловлено в основном наличием хронической патологии различной этиологии и постоянной интоксикацией продуктами воспаления. Могут усиливать иммунодепрессивное влияние и обильные кровопотери, и травмы, и перенесенные операции. Особое внимание клиницисты обращают на тесную взаимосвязь иммунитета с состоянием микробиотической флоры желудочно-кишечного тракта и ее дисбаланс, возникающий при нерациональном применении антибиотиков, кишечных инфекциях, стрессах, нерациональном питании и др.

Перечисленные положения подчеркивают необходимость дальнейшего изучения и совершенствования возможностей иммуномодулирующей терапии. Этим и объясняется тот факт, что начиная со второй половины XX века, иммунология все более активно интегрируется практически во все области клинической медицины.

К наиболее распространенным патологиям иммунной системы относятся: иммунодефицитные состояния, аллергические заболевания, аутоиммунные заболевания, лимфопролиферативные заболевания.

Иммунодефицитные состояния – это состояния, характеризующиеся снижением активности или неспособностью организма к эффективному осуществлению реакций клеточного и/или гуморального звена иммунитета.

Следовательно, иммунодефицит - это изменение иммунного статуса, обусловленное дефектами одного или нескольких механизмов иммунного ответа.

Косвенно на развитие иммунодефицита могут указывать изменения в рутинных анализах: лимфопения в общем анализе крови, изменения в составе белковых фракций в биохимическом анализе крови, выявление клинической манифестации инфекций, возбудителями которых является условно-патогенные микроорганизмы и другие [52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62].

Специальный лабораторный анализ иммунного статуса – иммунограмма, представляет собой совокупность показателей состояния основных звеньев иммунной системы: основные субпопуляции клеток приобретенного иммунитета - лимфоциты (Т-лимофциты, их субпопуляции - Т-хелперы и Т-эффекторы, В-лимфоциты, продуцирующие антитела).

Первичные иммунодефициты — это относительно редкие врожденные заболевания, связанные с генетическими дефектами одного или нескольких компонентов иммунной системы, общей чертой которых является наличие хронических инфекций с рецидивирующим течением, вызываемых низковирулентной флорой - оппортунистическими или условно-патогенными микроорганизмами. Инфекционные процессы при данной патологии характеризуются крайней тяжестью и затяжным течением (сепсис, гематогенный остеомиелит, септический артрит, менингит), развитием необычных или тяжелых осложнений инфекционных заболеваний. В настоящее время идентифицировано более 70 врожденных дефектов иммунной системы, и, по мере совершенствования методов молекулярной иммунодиагностики, их число будет только расти [63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77].

Принципы лечения первичных иммунодефицитных состояний

Основной метод лечения большинства первичных иммунодефицитов - пожизненная заместительная терапия иммуноглобулинами, которая при

своевременном и регулярном ее применении нормализует состояние больного, позволяет избежать клинических проявлений заболевания.

Лечение зависит от типа первичной иммунологической недостаточности и включает в себя целенаправленную заместительную терапию (пересадка иммунокомпетентных тканей, трансплантация эмбрионального тимуса, костного мозга, введение готовых иммуноглобулинов - γ-глобулинов, концентрированных антител, прямое переливание крови от иммунизированных доноров, введение гормонов тимуса) [78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97].

Вторичные иммунодефициты

Вторичные ИДС разделяют на 2 основные формы:

1. системные, развивающиеся вследствие системного поражения иммуногенеза (при лучевых, токсических, инфекционных, стрессорных поражениях);
2. местные, характеризующиеся регионарным поражением иммунокомпетентных клеток (локальные нарушения иммунного аппарата слизистой, кожи и других тканей, развившиеся вследствие местных воспалительных, атрофических и гипоксических нарушений).

Нарушения функционирования иммунной системы и развитие иммунной недостаточности может возникнуть при воздействии ряда неблагоприятных факторов: недостаточное и нерациональное питание, профессиональные вредности, экологические факторы, оперативные вмешательства, применение лекарственных препаратов и др., в результате чего и формируются *вторичные иммунодефицитные состояния* - нарушения иммунной системы, которые могут развиваться, как у детей, так и у взрослых, и не являются результатом какого-то генетического дефекта. Среди иммунодефицитных состояний вторичные иммунодефициты**,** по частоте возникновения,

безусловно, преобладают над первичными [98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106].

Перечень основных заболеваний, сопровождающихся вторичным иммунодефицитом, предложенный экспертами ВОЗ [107].

1. Инфекционные заболевания:

а) протозойные и глистные болезни – малярия, токсоплазмоз, лейшманиоз, шистозоматоз и др.;

б) бактериальные инфекции – лепра, туберкулез, сифилис, пневмококковые, менингококковые инфекции;

в) вирусные инфекции – корь, краснуха, грипп, эпидемический паротит, ветряная оспа, острый и хронический гепатиты и др.;

г) грибковые инфекции – кандидоз, кокцидиодомикоз и др.

2. Нарушения питания – истощение, кахексия, нарушения кишечного всасывания и др.
3. Экзогенные и эндогенные интоксикации – при почечной и печеночной недостаточности, при отравлении гербицидами и др.
4. Опухоли лимфоретикулярной ткани (лимфолейкоз, тимома, лимфогрануломатоз), злокачественные новообразования любой локализации.
5. Болезни обмена (сахарный диабет и др.).
6. Потери белка при кишечных заболеваниях, при нефротическом синдроме, ожоговой болезни и др.
7. Действие различных видов излучения, особенно ионизирующей радиации.
8. Сильные, длительные стрессорные воздействия.
9. Действие лекарственных препаратов (иммунодепрессанты, кортикостероиды, антибиотики, сульфаниламиды, салицилаты и др.).
10. Блокада иммунными комплексами и антителами лимфоцитов при некоторых аллергических и аутоиммунных заболеваниях.

Принципы лечения вторичных иммунодефицитных состояний

Основная область клинического применения иммуномодуляторов - вторичные ИДС, проявляющиеся частыми рецидивирующими или резистентными к терапии инфекционно-воспалительными заболеваниями. В настоящее время четко сформулированы основные принципы применения иммуномодуляторов [108, 109, 110]:

- Основное показание для применения иммуномодуляторов - лечение и профилактика синдрома вторичного иммунодефицита.
- Необходимо четко определить у пациента клинические признаки иммунологической недостаточности.
- В процессе лечения иммуномодуляторами необходим иммунологический мониторинг.
- Иммуномодуляторы - средства 2-й линии в комбинированной фармакотерапии заболеваний.
- Иммуномодуляторы необходимо использовать в строгом соответствии с утвержденными Министерством здравоохранения схемам и применять только зарегистрированные в официальном порядке лекарственные средства.

Основными критериями оценки эффективности курса иммуномодулирующей терапии являются:

- снижение частоты рецидивов инфекционных заболеваний у пациента;
- уменьшение потребности в базисной фармакотерапии;
- нормализация иммунного статуса;
- уменьшение сроков госпитализации и длительности обострения заболевания.

Таким образом, сочетание базовой фармакотерапии терапии с рациональной иммунокоррекцией можно считать оправданным и важным

звеном в комплексе мероприятий по предупреждению рецидивов и лечению заболеваний, а также в профилактике иммунодефицитов [111, 112, 113, 114].

Однако следует признать, что в применении ЛС, влияющих на иммунную систему человека, в особенности относительно профилактики и лечения вторичных ИДС, остается очень много нерешенных вопросов. Причем, разброс мнений начинается от практически полного отрицания эффективности использования иммуномодулирующих ЛС, до придания им статуса «панацеи» и реального злоупотребления в назначении этих ЛС при терапии и профилактике различных заболеваний, как у взрослых, так и у педиатрических пациентов.

Обычно сторонники первого утверждения ссылаются на данные доказательной медицины, согласно которым применение иммуномодуляторов не имеет к настоящему времени достаточной доказательной базы. Утверждается, что препараты этой группы используются зачастую необоснованно и только в странах постсоветского пространства.
Нам кажется, что при формировании мнения специалистов относительно места иммунотропных препаратов в профилактике и лечении вторичных иммунодефицитов необходимо учитывать сложившуюся реальную ситуацию по клиническому применению ЛП данной группы в лечении и профилактике различных заболеваний [115].

Иммунотропные средства входят в международную классификацию АТХ и образуют группы «Иммуностимулирующие средства» (Код АТХ L03) с подгруппами колониестимулирующие факторы, интерфероны, интерлейкины, другие иммуностимулирующие средства; и «Иммуносупрессивные средства» (Код АТХ L04) с подгруппами иммуносупрессоры, исключая кортикостероиды селективные иммуносупрессоры, другие иммуносупрессоры [116].

Все современные учебные программы подготовки специалистов с высшим фармацевтическим и медицинским образованием включают изучение иммуностимулирующих и иммуносупрессивных ЛП, что

предполагает необходимость обеспечения соответствующего уровня знаний у выпускников по этой фармако-терапевтической группе ЛС с учетом, как позиций доказательной медицины, так и реальной клинической и фармацевтической практики [117, 118, 119].

Кроме того, следует учитывать динамику развития как клинической иммунологии так и клинической фармакологии и фармакотекрапии. Иммуномодулирующие ЛС в настоящее время вызывают интерес не только у исследователей стран СНГ, но и во всем мире. К качестве примеров можно привести работы Steurer-Stey C.et al., (2004) и других исследователей [120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128].

Таким образом, фармакокоррекция иммунодефицитных состояний, закономерно сопровождающих течение многих острых и хронических инфекционно-воспалительных заболеваний, гнойной инфекции в хирургии, профессиональных болезней и др., продолжает оставаться актуальной проблемой.

1.2. Характеристика основных групп иммуномодулирующих средств

К группе иммуномодулирующих относят ЛС, которые обладают способностью стимулировать иммунные процессы, восстанавливать нарушенные функции иммунной системы, активировать иммунокомпетентные клетки (Т- и В-лимфоциты), а также дополнительные факторы иммунитета (макрофаги, систему комплемента и др.).

Несмотря на то, что к настоящему времени существующая доказательная база по отдельным группам иммуномодуляторов явно недостаточна, на фармацевтическом рынке присутствует достаточно большое количество иммунотропных ЛП, которые официально зарегистрированы и разрешены для медицинского применения.

Так, на мировом фармацевтическом рынке представлены более 100 МНН и около 400 торговых наименований иммуномодуляторов и насыщенность рынка ЛП этой группы продолжает расти [129].

Существует достаточно много классификаций иммуномодулирующих ЛС, но наиболее полная из них основана на химическом строении и происхождении иммуномодуляторов.

I. Препараты экзогенного происхождения

1. Бактериальные
2. Растительные

II. Препараты эндогенного происхождения

1. Иммунорегуляторные пептиды:
   - естественные;
   - химически синтезированные.
2. Цитокины:
   - интерлейкины;
   - интерфероны (природные, рекомбинантные);
   - индукторы интерферона (природные, синтетические).

III. Химически чистые и синтезированные препараты

1. Вещества, полученные с помощью направленного синтеза.
2. Аналоги иммуномодуляторов эндогенного происхождения.

С практической точки зрения для использования в клинической иммунологии наиболее удобна классификация иммуномодулирующих ЛС по Д.К. Новикову 2009 [130]:

I. Средства бактериального происхождения:

1. Лизаты бактерий: бронхо-мунал, имудон, рибомунил, ИРС-19
2. Микробные макромолекулярные соединения: мурамилдипептид, пирогенал, продигиозан, нуклеинат натрия

II. Средства растительного происхождения: эхинацея пурпурная.

III. Цитокины и медиаторы:

1. тимические гормоны: тактивин, тималин, тимоген;

2. пептиды костного мозга: миелопид;

3. индукторы интерферона: криданимод, тилорон, меглумин акридонацетат, арбидол, амизон.

4. Интерфероны: интерферон а, интерферон Р.

5. Интерлейкины: интерлейкин-1, интерлейкин-2.

6. Колониестимулирующие факторы: филграстим, молграмостим, сарграмостим.

7. Моноклональные антитела: инфликсимаб, адалимумаб, омализумаб.

IV. Синтетические иммуномодуляторы: левамизол, галавит, полиоксидоний.

Иммуномодуляторы бактериального происхождения. Высокая профилактическая и клинико-иммунологическая эффективность бактериальных иммуномодуляторов доказана результатами целой серии рандомизированных, контролируемых исследований (РКИ), а также представлена в систематических обзорах и мета-анализах [131, 132, 133, 134, 135, 136].

В основе механизма действия ЛП данного класса лежат процессы, инициирующие естественную активацию иммунитета. Так, входящие в состав бактериальных иммуномодуляторов универсальные «маркеры чужеродности» (фрагменты клеточной мембраны, содержащие липополисахариды и/или протеогликаны), распознаются Toll-подобными рецепторами гранулоцитов и дендритных клеток, что является первоначальным импульсом для активации врожденного иммунитета. При этом усиливается фагоцитоз в исполнении нейтрофилов, моноцитов и тканевых макрофагов, активироваться образование антигенспецифических Т-хелперов и Т-киллеров, повышается активность дендритных клеток, усиливается продукция интерферона и других цитокинов. Благодаря стимуляции факторов врожденного иммунитета повышается противоинфекционная резистентность, что активно препятствует

размножению как вирусных, так и бактериальных возбудителей, в случае их проникновения в организм [137, 138].

Механизм действия иммуномодуляторов микробного происхождения заключается в усилении функциональных свойств фагоцитов, с увеличением фагоцитоза и внутриклеточного киллинга поглощенных бактерий. Помимо этого, при их применении, возрастает продукция противовоспалительных цитокинов, необходимых для инициации гуморального и клеточного иммунитета. В результате может увеличиваться продукция антител.

Кроме этого, бактериолизаты и рибосомально-протеогликановые комплексы, благодаря антигенам, содержащимся в их составе, активируют адаптивный иммунитет, вызывая вакциноподобный эффект. При этом отмечено, что специфическая антителопродукция осуществляется преимущественно в системе местного иммунитета. Увеличение концентрации специфических иммуноглобулинов в секретах (слюна, назальная и трахеобронхиальная слизь) против тех пневмотропных бактериальных возбудителей, антигены которых представлены в препаратах, определяет высокий профилактический потенциал терапии, существенно снижая риск рецидивов респираторных бактериальных инфекций. Учитывая, что современные бактериальные иммуномодуляторы являются высокоочищенными препаратами, изготовленными из инактивированных возбудителей, их применение характеризуется не только клинико-иммунологической эффективностью, но и высоким профилем безопасности [139, 140, 141, 142].

Препарат Бронхо-Ваксом представляет собой лиофилизированный лизат 8 бактерий, наиболее часто вызывающих инфекции дыхательных путей (Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneu moniae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Moraxella catarralis, Haemophilus influenzae, Klebsiella ozaenae, Streptococcus viridans). Механизм иммуномодулирующего действия Бронхо-Ваксома хорошо изучен в экспериментальных и клинических условиях [143, 144, 145, 146].

К преимуществам Бронхо-Ваксома следует отнести и его высокий клинический эффект, который был выявлен у взрослых пациентов (уровень доказательности В). Во многих плацебо контролируемых исследованиях у взрослых была показана его терапевтическая эффективность, достигающая 40,0–74,5 % у больных хроническим бронхитом и ХОБЛ [147] В рандомизированном двойном слепом исследовании, в котором приняли участие 354 пациента пожилого возраста, показано, что Бронхо-Ваксом снизил на 40 % частоту острых бронхитов у пациентов с ХОБЛ и на 28 % – общее количество инфекций нижних дыхательных путей, а также уменьшил появление устойчивых штаммов микроорганизмов и развитие других осложнений антибиотикотерапии, позволил сократить общие затраты на лечение больных. В двойном слепом исследовании изучалось применение Бронхо-Ваксома с целью профилактики обострений заболевания у 381 пациента с ХОБЛ [148, 149, 150]. Показано уменьшение риска госпитализации на 30 %, длительности пребывания в стационаре – на 55 %, а, следовательно, и снижение стоимости лечения пациентов. Данные результаты были получены при 3 месячной схеме введения и учете результатов в течение 6 месяцев наблюдения.

Препарата Бронхомунал. В состав ЛП Бронхомунал так же входят лиофилизированные лизаты комплекса 8 бактерий: стрептококков (Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus viridans, Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella ozaenae, Moraxella catarrhalis). Также препарат содержит вспомогательные компоненты: пропил галлат, глутамат натрия (безводный), маннитол, стеарат магния, маисовый крахмал.

Действие Бронхомунала достаточно узко направлено – стимулирование собственных защитных механизмов организма в борьбе против инфекционных заболеваний, таких как ОРИ, бронхиты, тонзиллиты, фарингиты, риниты, ларингиты, синуситы, отиты. ЛП также активизирует общий иммунный ответ на воздействие этих болезнетворных организмов.

Благодаря такому стимулированию собственного иммунитета снижается частота, длительность и тяжесть заболеваний, а следовательно, и потребность в применении антибиотиков и других лекарств. В плацебо контролируемых исследованиях была доказана терапевтическая эффективность Бронхомунала у 51,0–70,5 % больных хроническим бронхитом и ХОБЛ, при этом частота обострений болезни снижалась на 28 %, а частота госпитализаций – на 30 % [151, 152] (уровень доказательности В).

Препарат Рибомунил - в состав которого входят рибосомы бактериальные 0,75 мг (в т. ч. рибосомы Haemophilus influenzae – 0,5 доли, Streptococcus pyogenes – 3,0 доли, Klebsiella pneumoniae – 3,5 доли, Streptococcus pneu moniae – 3,0 доли), мембранные протеингликаны 1,125 мг и другие компоненты (магния стеарат – 6 мг, сорбитол – до 294 мг кремний – 1,5 мг). ЛП имеет иммуномодулирующее действие, является рибосомально-протеогликановым комплексом, содержащим в составе рибосомы наиболее часто встречающихся возбудителей инфекций дыхательных путей.

ЛП активирует гуморальный и клеточный иммунитет. Рибосомы, входящие в состав Рибомунила, содержат антигены, которые являются идентичными бактериальным поверхностным антигенам, поэтому, попадая в организм, стимулируют выработку специфических антител к данным микроорганизмам (т. н. эффект пероральной вакцины). Именно за счет рибосомальных антигенов Рибомунил обладает способностью стимулировать синтез специфических антител к Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneu moniae, Haemophilus influenzae, Klebsiella pneumoniae. Протеогликаны мембран активируют неспецифический иммунитет, вследствие чего усиливается фагоцитарная активность полинуклеарных лейкоцитов и макрофагов, повышается активность неспецифической резистентности организма. Рибомунил стимулирует функциональную активность В- и Т-лимфоцитов, синтез секреторных и сывороточных иммуноглобулинов (IgA), интерлейкинов-1, гамма- и альфа-интерферонов. В этом заключается профилактическое иммунологическое действие препарата (по отношению к

респираторным инфекциям, вызванным вирусами). Рибомунил индуцирует мембранную экспрессию CD83, CD86 и молекул человеческого лейкоцитарного антигена класса II (HLA) на дендритных клетках (ДК), что является маркером зрелости для ДК. Дополнительно была продемонстрирована повышенная продукция IL-12, что может свидетельствовать о том, что стимулированные Рибомунилом ДК могут также запускать Th1 ответ [153]. Рибомунил повышает выработку различных цитокинов, принимающих участие в воспалительном ответе, таких как TNF-α, моноцитарный хемотаксический протеин (MCP1, также известен как хемокиновый лиганд CCL2), IL-8 и IL-6. Самый вероятный механизм иммуностимуляции Рибомунилом – это активация макрофагов, моноцитов, ДК, полиморфо-ядерных клеток и НК-клеток.

Свойства Рибомунила обеспечивают препарату хорошую эффективность, подтвержденную в 19 европейских двойных слепых плацебо контролируемых исследованиях и обобщенную в метаанализе (общее число пациентов 2117: 902 взрослых и 1 215 детей; из них Рибомунил принимали 1 062, плацебо – 1055 пациентов) [154, 155]. Прием Рибомунила позволил уменьшить число рецидивов респираторных инфекций на 54–78 %, длительность рецидива – на 42–79 %, необходимость использования антибиотиков – на 38 %.

Было проведено рандомизированное двойное слепое исследование влияния Рибомунила на клиническую картину и показатели иммунитета больных хроническим бронхитом с частыми (> 3 раз в год) и длительными (≥ 21 день) обострениями [156]. Пациенты получали Рибомунил или плацебо, наблюдение осуществлялось в течение 2 лет с момента начала исследования. У 35 % больных хроническим бронхитом, получавших Рибомунил, наблюдалась стойкая ремиссия заболевания в течение года с момента начала приема препарата, у 49 % пациентов – достоверное снижение количества и длительности.

Препарат ИРС-19 (IRS-19) - содержит лизат 19 бактерий, которые являются наиболее частой этиологической причиной респираторной патологии. Данный препарат практически исключительно обеспечивает активацию неспецифического и IgA- опосредованного гуморального иммунитета. Вследствие низкой иммуногенности может применяться у детей в возрасте до 3 месяцев.

Интересной особенностью ИРС-19 является его способность переключать иммунный ответ с ИФу-опосредованного пути (Th1) на IL-4 опосредованный путь (Th2). ИРС-19 применяется, в основном, при респираторной и ЛОР-патологии у лиц с вторичными ИД [157, 158, 159, 160].

Оценка доказательной базы. В настоящее время группа бактериальных иммуномодуляторов активно используется в клинической практике. Тем не менее, их доказательная база представлена в основном разрозненными рандомизированными клиническими испытаниями с ограниченным числом включенных пациентов, использованием вторичных точек контроля эффективности. Поэтому в настоящее время уровень их доказательности соответствует категории IIB [161].

Группа микробных макромолекулярных соединений представлена препаратом Нуклеинат натрия (Natrii nucleinas, Derinat). Нуклеинат натрия представляет собой натриевые соли ДНК и РНК, которые получены при гидролизе клеток дрожжей. Деринат - очищенная натриевая соль ДНК дрожжевых клеток.

Механизм действия этого ЛП остается окончательно не установленным. При приеме внутрь и нанесении на кожу и слизистые, очевидно, подвергается частичному гидролизу до олигонуклеотидов, которые захватываются макрофагами иммунной системы кишечника (Пейеровых бляшек), кожи (клетки Лангерганса) и индуцируют развитие системного иммунного ответа. Фармакологические эффекты:

- повышает фагоцитарную активность макрофагов,

- стимулирует секрецию иммунными клетками ростовых факторов: IL-1,4 и TNFa, что обеспечивает лимфопоэз в региональных лимфатических узлах в зоне аппликации нуклеината натрия [162, 163, 164].

Нуклеинат натрия применяют в качестве неспецифического стимулятора лейкопоэза при умеренной лейкопении, агранулоцитозе в дозе 100-200 мг внутрь 4 раза в сутки на протяжении 10 дней.

В качестве иммуномодулятора при хронических инфекционных процессах и вторичных ИД нуклеинат натрия применяют по 1,0-2,0 г в сутки в 3-4 приема на протяжении 2-12 недель.

Оценка доказательной базы. В настоящее время деринат весьма агрессивно продвигается на фармацевтический рынок стран СНГ. В то же время его доказательная база ограничена разрозненными нерандомизированными испытаниями, часто выполненными с огрехами в методологии исследования и наличием конфликта интересов (Уровень доказательности С) [161].

Иммуномодуляторы эндогенного происхождения. В настоящее время в качестве иммуномодуляторов эндогенного происхождения применяются. Иммунорегуляторные пептиды:

- Препараты тимуса влияющие на Т-лимфоциты: тималин, тимоген, тимотропин, Т-активин (тактивин), берофор, тимостимулин, тимоптин, вилозен.
- Цитокины, интерфероны и эффекторные белки иммунной системы (иммуноглобулины).

В основе механизма действия данных ЛП лежит способность, связываясь со специфическими рецепторами, изменять образование и концентрацию в цитоплазме иммунокомпетентных клеток вторичных мессенджеров: цАМФ, ИЗФ, ДАГ, ионов кальция с последующей передачей сигнала на различные индукторы.

Ряд пептидных препаратов тимуса способны вызывать стимуляцию синтеза простагландинов группы Е, действие которых, вероятно, реализуется

через цГМФ. Таким образом, изменяя в клетках соотношение цГМФ/цАМФ, пептидные препараты тимуса способны регулировать процессы пролиферации/дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

Иммуностимулирующее действие пептидов тимуса и их аналогов выражается в адекватном изменении функционального состояния клеток Т-системы иммунитета, тенденцией к восстановлению баланса субпопуляций Т-лимфоцитов и их функциональной активности. При этом сниженные показатели могут увеличиваются, а гиперреактивные процессы среди отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов возвращаются до значений, близких к нормальному уровню, что свидетельствует о наличии у препаратов иммуномодулирующего эффекта. Под влиянием препаратов усиливается продукция альфа- и гамма-интерферонов. Помимо стимуляции Т-системы иммунитета, вторично, могут стимулировать В-систему и макрофагально/моноцитарное звено иммунитета, активность ЕК-клеток [165, 166].

Синтетические иммуномодуляторы

Азоксимера бромид (Полиоксидоний) - начиная с 1983 г., группой авторов под руководством Р.В. Петрова детально изучался механизм его действия на все звенья иммунной системы [167]. Одним из главных биологических свойств Полиоксидония является его способность стимулировать антиинфекционную резистентность организма. Установлено, что этот ЛП оказывает активирующее действие на неспецифическую резистентность организма, фагоцитоз, гуморальный и клеточный иммунитет.

Иммуномодулирующее действие полиоксидония проявляется в отношении локальных и генерализованных инфекций. Основой механизма иммуномодулирующего действия полиоксидония является прямое воздействие на фагоцитирующие клетки и естественные киллеры, а также стимуляция антителообразования [168, 169, 170, 171]. Мишенями для Полиоксидония являются клетки фагоцитарной системы и естественные киллеры. Он может стимулировать или оказывать костимулирующий эффект

на продукцию этими клетками IL-1b, IL-6, TNFa и а-интерферона. Другим важным свойством Полиоксидония является его способность усиливать способность фагоцитов убивать бактерии. При недостаточности гуморального иммунитета Полиоксидоний существенно усиливает антителообразование. Помимо иммуномодулирующего эффекта, Полиоксидоний характеризуется наличием детоксицирующей, антиоксидантной и мембраностабилизирующей активности. Это является обоснованием для применения полиоксидония в комплексном лечении острых и хронических инфекций любой этиологии. Эти же свойства являются основанием для применения Полиоксидония для иммунореабилитации онкологических больных [172, 173].

Оценка доказательной базы. Доказательная база ограничена отдельными РКИ, к сожалению, часто выполненными с методологическими погрешностями и наличием конфликта интересов (Уровень доказательности С) [161].

1.3. Иммуномодулирующие средства растительного происхождения: эффективность, безопасность, использование

Лекарственные растения, как возобновляемый сырьевой ресурс, являются богатым потенциальным источником новых природных соединений, обладающих широким спектром фармакологической активности.

Систематические исследования в области фитотерапии способствовали тому, что за последнее десятилетие некоторые лечебно-профилактические средства растительного происхождения с иммуномодулирующим действием заняли одно из ведущих мест среди лекарств, применяющихся в клинической практике.

Как известно, фитопрепараты отличаются слабым аллергизирующим действием, по сравнению с синтетическими соединениями, которые являются ксенобиотиками - веществами, чужеродными для организма. Препараты из растений, благодаря наличию в своем составе комплекса природных физиологически активных веществ, мягко воздействуют на организм в целом и корригируют его измененные функции.

Природные биоактивные вещества (БАВ) взаимно дополняют и усиливают действие друг друга, и при этом во многих случаях происходит не просто фитотерапевтическое воздействие на тот или иной орган или систему органов, но и существенно повышается общая резистентность организма [174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191].

Немаловажным является и то, что обладая достаточной эффективностью, минимальным риском развития побочных эффектов, простотой и удобством применения, фитопрепараты имеют относительно низкую себестоимость, благодаря чему эта группа препаратов экономически доступна для большинства пациентов.

ВОЗ полностью признает значение растительных лекарств для здоровья многих народов мира, что отражено в ряде решений Всемирной Ассамблеи Здоровья (1998) [192].

Растущий интерес к их употреблению стимулировал исследования растительных лекарств разного назначения и применения. Даже в странах Запада, где основное внимание уделяется синтетическим препаратам, свыше 25% лекарственных средств получают на основе растительного сырья. Так, по результатам анализа, проведенного Национальным институтом США по изучению рака (National Cancer Institute, NCI) в 2007 году, установлено, что действующие вещества для 2/3 лекарственных препаратов, разработанных в предшествующие 25 лет, имели природное происхождение. При изучении составляющих компонентов противоопухолевых средств, используемых в

течение 1940 г.- 2014 г., из одобренных 175 молекул 49% являлись веществами природного происхождения [193, 194].

Поиск лекарственных веществ природного происхождения продолжает оставаться актуальным и в настоящее время. Свидетельством тому является присвоение в 2015 году Нобелевской премии по медицине и физиологии китайскому фармакологу Ту Юю за открытие сесквитерпенового лактона артемизина из полыни однолетней (*Artemisia annua*). Этот препарат в настоящее время используется во многих странах в качестве лекарственного средства первой линии при лечении малярии в связи с возрастающей устойчивостью малярийного плазмодия к препаратам предыдущего поколения [7].

Исходя из этого, Всемирная организация здравоохранения решила поддерживать использование растительных лекарств и поощряет применение лекарственных средств растительного происхождения, безопасность и эффективность которых доказана.

В документах ВОЗ признается важность и недооцененность народной и дополнительной (альтернативной) медицины, а также констатируется растущий спрос на данные методы лечения как в развитых, так и в развивающихся странах. В Стратегии ВОЗ рекомендуются меры вмешательств по интеграции народной медицины в существующие национальные системы здравоохранения на основе создания соответствующих нормативных документов, касающихся лечебных практик и специалистов, их применяющих, надлежащего проведения научных исследований, контроля качества, безопасности и эффективности гербальной медицины в клинической практике [195, 196, 197, 198, 199].

Во второй половине XX века очень активно изучались лекарственные растения, обладающие иммуномодулирующими и адаптогенными свойствами - элеутерококк колючий, женьшень, эхинацея, левзея сафлоровидная, родиола розовая [200, 201, 202, 203, 204].

Однако, несмотря на это, и на сегодняшний день нет однозначного и полного понимания механизма иммунотропного действия фитопрепаратов.

Лекарственные растения, обладающие иммуномодулирующим действием условно разделяют на две группы: в первую группу входят природные иммуномодуляторы, которые применяются исключительно под контролем иммунолога с индивидуальным подбором и дозировкой, поскольку действующие вещества этих лекарственных растений могут проявлять свойства как иммуностимуляторов, так и иммуносупрессантов. Сюда относят препараты на основе солодки, омелы белой, кубышки желтой, касатика молочно-белого.

Растительные иммуномодуляторы второй группы наиболее часто используемы и известны более широко, это: родиола розовая; аралия; лимонник, женьшень и эхинацея. Все перечисленные растения иммуномодуляторы часто используются без наблюдения врача, и определенный период времени, наибольшее распространение имеют в сезон простуд. Эти природные иммуномодуляторы, не нарушая гормональный баланс, мягко воздействуют на функции нервной, иммунной и эндокринной системы.

Родиола розовая (Rhodíola rósea, семейство Толстянковые). Полезные свойства родиолы розовой до середины прошлого века оставались практически неизвестными науке, мало изученными. Произрастает исключительно на Дальнем Востоке и Алтае [205].

Целебные свойства родиолы розовой обусловлены наличием большого количества биологически активных соединений - это сахара, аминокислоты, гликозиды, кумарины, алколоиды, фитонциды, пектины, витамины, микроэлементы, эфирные масла. В корневищах содержится большой запас макро- и микроэлементов: цинк, медь, серебро, свинец, никель, кобальт, селен, титан, магний, хром, барий, марганец [206].

В Кыргызстане Родиола розовая не произрастает, однако в высокогорных районах Кыргызской Республики произрастают другие виды

Родиолы: Родиола линейнолистная (Rhodiola linearifolia), Родиола ярко-красная (Rhodiola coccinea), Родиола памироалайская (Rhodiola pamiroalaica Boriss), Родиола холодная (Rhodiola gelida), Родиола Литвинова (Rhodiola Litwinowii Boriss) [207, 208].

Отечественными учеными были проведены исследования по изучению фитохимического состава видов Родиолы, произрастающих в Кыргызстане, в результате которых было установлено, что наибольшее количество биологически активных веществ содержится в Родиоле линейнолистной – алкалоиды, флавоноиды, сапонины, дубильные вещества, кумарины эфирные масла [209].

На основе подземных частей видов рода родиола (*Rhodiola*) в России были разработаны ЛС психостимулирующего действия, внедренные в медицинскую практику [210]. В дальнейшем профессорами В.А. Куркиным и Г.Г. Запесочной выявлено, что к числу основных действующих веществ родиолы розовой помимо фенолоспиртов относятся также циннамилгликозиды (в основном розин и розавин) [211, 212].

Экстракт родиолы и его фенольные компоненты обнаружили значительную антиоксидантную активность в сочетании с противоопухолевым и антиметастатическим действием [213, 214].

Препараты родиолы розовой нормализуют нервную деятельность, оказывают влияние на улучшение памяти, повышают умственную и физическую работоспособность. Особенно это заметно при использовании препаратов при выполнения тяжелой физической работы, переутомлении. Адаптогенные свойства родиолы розовой повышают устойчивость организма к неблагоприятным факторам - вирусы, микробы, экологическое загрязнение, отравление, недостаток кислорода, перегрузки.

Лимонник китайский (Schisandra chinensis). Род лимонник объединяет 25 видов, большинство из которых произрастает в Китае. Лимонник китайский - единственный вид, который встречается на территории России [215].

Лимонник применяют как общеукрепляющее, активизирующее сердечную деятельность, регулирующее кровообращение средство. С древних времён у жителей Дальнего Востока лимонник был популярен как тонизирующее средство. Свойства лимонника хорошо изучены. Препараты из него (настойка и таблетки) используют в научной медицине. Они оказывают тонизирующее, адаптогенное действие, повышают работоспособность при умственном и физическом переутомлении, стимулируют деятельность сердечно-сосудистой и дыхательной систем [216].

Женьшень (Panax ginseng) семейства аралиевых (Araliaceae). Химический состав. Корень содержит тетратерпеновые сапонины, панаксозиды. Установлены структура агликона и состав углеводной части. Кроме того, в корне женьшеня содержатся следы эфирного масла, жирное масло, фитостерины, смолы, пектиновые вещества, крахмал, витамины, жирные кислоты, смесь которых называют панаксовой кислотой, много микроэлементов - железа, марганца и др. Биохимическими исследованиями установлено, что листья женьшеня имеют примерно одинаковый с корнями химический состав [217].

Действие женьшеня объясняется его возбуждающим действием на кору и подкорковые образования головного мозга, положительным влиянием на формулу крови, увеличением газообмена, стимуляцией тканевого дыхания (особенно мозга), увеличением амплитуды сердечных сокращений, урежением сердечного ритма, ускорением заживления язв. Препараты женьшеня оказывают стимулирующий и тонизирующий эффект, в связи с чем их с успехом применяют при физической и умственной усталости, после продолжительных болезней, при гипотонии и неврастении, вегетоневрозах, депрессивных состояниях [201].

Как следует из вышеприведенных данных, растительные иммуномодуляторы достаточно прочно вошли в практическую медицину и чаще всего применяются для лечения и профилактики простудных заболеваний. На сегодня самые широко применяемые в мире

иммуномодуляторы – коммерческие препараты эхинацеи. За несколько лет со времени появления на мировом фармацевтическом рынке они опередили другие растительные препараты по объемам продаж за всю историю их существования.

Род Echinacea входит в состав семейства сложноцветных (Compositae или Asteraceae) и включает 11 видов растений. Хорошо известны и широко используются в медицинских целях три из них: эхинацея пурпурная (E. purpurea), эхинацея бледная (E. pallida) и эхинацея узколистая (E. angustifolia*)* [218].

Эхинацея пурпурная растет в Северной Америке в прериях и по песчаным берегам рек, на влажных плодородных почвах, всегда на открытых пространствах [219].

Химический анализ растений рода *Echinacea* определил в их составе 7 основных групп БАВ, которые включают полисахариды, флавоноиды, производные кофейной кислоты, эссенциальные липиды, алкиламиды ненасыщенных кислот, дубильные вещества, макро- и микроэлементы. Важнейшими БАВ эхинацеи являются полисахариды, обладающие иммуностимулирующими и умеренными противовоспалительными свойствами. Эхинакозиды - особые комплексы из глюкозы, рамнозы и кофеиновой кислоты, характерные для эхинацеи.

К наиболее важным производным кофейной кислоты относятся эхинозиды, хлорогенная кислота, синарин. Всего обнаружено 17 её производных. Кофейная кислота и её производные обладают антибактериальной, противогрибковой, антиоксидантной и мембраностабилизирующей активностью. Эхиназиды в основном аккумулируются в корнях, эффективны в отношении многих вирусов, бактерий, грибков и простейших.

Эхиназиды проявляют также защитный эффект против свободных радикалов, образующихся при разрушении коллагена типа III, допуская возвращение коллагена к его естественному состоянию. Эхинакоцид

обладает бактерицидной активностью в отношении золотистого стафилококка. В конце 80-х годов XX века в Германии были запатентованы экстракты эхинацеи с содержанием цикориевой кислоты, обладающей иммуностимулирующими свойствами. Алкиламиды ненасыщенных кислот корней эхинацеи пурпурной обладают противовоспалительным действием. Препараты из эхинацеи обладают противомикробным, противовирусным и противогрибковым действием, противовоспалительными, антиоксидантными свойствами, стимулируют реакции клеточного и гуморального иммунитета, ускоряют процесс заживления ран, язв. Как иммуномодулятор, эхинацея используется также при психическом и физическом переутомлении, после антибиотикотерапии, цитостатической и лучевой терапии. В исследованиях на животных показаны «противовозрастные» (anti-aging) и противоопухолевые эффекты эхинацеи при лейкемии [219].

Наиболее широко изученным растением рода *Echinacea* является Эхинацея пурпурная, на основе которой получены ЛП Echinacin liquidum, Echinal, Extr. Echinaceae, Tinc. Echinaceae, Immunal. В качестве референтного препарата в данной группе выступает эхинацин - смесь 80 мл свежего сока Echinacea purpurea, полученного прессованием и 22 объемных % этанола на каждые 100 г препарата.

Наиболее вероятными действующими началами эхинацеи являются цикориевая кислота, алкиламиды ненасыщенных кислот и полисахариды. Однако, поскольку нет точных данных о конкретном действующем начале, препараты эхинацеи в настоящее время не подвергаются биологической стандартизации.

Мета-анализ 26 КИ эхинацеи, проведенных в 1990-1997 гг., позволил четко показать, что иммуномодулирующий эффект эхинацеи в условиях целого организма заключается исключительно в повышении неспецифической активности противоинфекционного иммунитета.

Экстракт эхинацеи способствует миграции фагоцитов в очаг поражения, стимулирует фагоцитоз, продукцию активных форм кислорода,

которые разрушают антиген. Основным веществом, с которым связана эта форма активности является липидная фракция препарата (эхинацеин, эхинолон) и цикориевая кислота.

Анализ 13 рандомизированных двойных слепых плацебоконтролируемых исследований, в которых препараты эхинацеи применялись с терапевтической целью при инфекциях верхних дыхательных путей, продемонстрировал их клиническую пользу [220].

В более позднем Кокрановском мета-анализе, включавшем 22 РКИ, сделано заключение, что разные препараты эхинацеи существенно различаются по эффективности [221]. Доказана терапевтическая эффективность при простудных заболеваниях только для препаратов из надземных частей E. purpurea. Авторы мета-анализа отметили также, что эхинацея, возможно, полезна и при профилактическом применении, однако это необходимо подтвердить в дальнейших исследованиях.

В систематическом обзоре, специально посвященном оценке безопасности препаратов эхинацеи, сделан вывод о благоприятном профиле их безопасности и хорошей переносимости [222].

По данным КИ, частота ПЭ препаратов эхинацеи лишь немного превышает таковую у плацебо. Только желудочно-кишечные расстройства и аллергические реакции встречались в группе пациентов, получавших препараты эхинацеи несколько чаще, чем в группе плацебо.

Общепринятыми противопоказаниями к применению препаратов эхинацеи считаются заболевания, связанные с гиперактивацией аутоиммунитета, аллергия на эти препараты. Препараты с эхинацеей противопоказаны при туберкулезе, лейкозе, рассеянном склерозе, ревматизме, ревматоидном артрите, системной красной волчанке, системной склеродермии, узелковом периартериите.

Оценка доказательной базы. Растительные ЛС с иммуномодулирующим действием весьма популярны у населения, однако

доказательная база иммуномодуляторов растительного происхождения остается недостаточной, уровень доказательности соответствует IIIB [161].

Заключение по 1 главе

Представленный в данной главе анализ и обобщение данных научной литературы по теме исследования, позволил прийти к следующим выводам:

- фармакокоррекция иммунодефицитных состояний, закономерно сопровождающих течение многих острых и хронических инфекционно-воспалительных заболеваний, продолжает оставаться актуальной проблемой современной медицины и фармации;
- накопленный к настоящему времени объем научных данных не позволяет рассматривать иммуномодуляторы как средства целевой иммунофармакотерапии, однако при этом ЛП этой фармакотерапевтической группы могут обеспечить значительное повышение эффективности базовых ЛП, т.е. средств этиотропной терапии;
- в связи с постоянно растущим спросом на лекарственные препараты, обладающие иммуномодулирующим действием, одной из актуальных задач фармации и фармакологии является разработка иммунотропных средств растительного происхождения.

ГЛАВА 2
МАРЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы исследований

Объектами изучения являлись сухой экстракт из надземных частей Padus Graynae Maxim, готовые твердые лекарственные формы (ГЛФ) фитопрепарата Padus Grayana Maxim.

Предмет исследования

Разработка состава и оптимальной технологии получения твердых лекарственных форм из сухого экстракта Padus Graynae Maxim. Выбор и обоснование показателей качества ГЛФ и разработка методов их определения.

Разработка проекта технологического регламента производства ГЛФ из сухого экстракта Padus Graynae Maxim.

Изучение токсикологических характеристик и фармакологических свойств фитопрепарата из сухого экстракта Padus Graynae Maxim.

Целью фармацевтической разработки является создание качественного лекарственного препарата и процесса его производства, обеспечивающего постоянный выпуск продукции с заданными функциональными характеристиками.

Данные, полученные в ходе фармацевтической разработки, а также опыт производства являются основой для установления проектных параметров, спецификаций и производственного контроля и служат основой для управления рисками для качества, т.к. качество не может быть проверено только в препаратах – качество препарата должно быть заложено при его разработке [223].

Общая методология исследований, выполненных в рамках данной диссертационной работы, представлена на рисунке 2.1.

Рис. 2.1. Общая методология исследований

Методы исследования

При проведении маркетингового анализа фармацевтического рынка иммуномодулирующих средств Кыргызской Республики *объектами исследования* являлись производственные процессы в фармацевтических организациях, направленные на обеспечение населения иммуномодулирующими средствами.

Материалами исследования послужили данные ДЛО и МТ МЗ КР о регистрации фармацевтической продукции в КР (Государственный реестр ЛС и ИМН, 2016 г.), прайс-листы оптовых фармацевтических компаний (г. Бишкек).

Для оценки скорости движения лекарственных средств из группы иммуномодуляторов использовалась формула расчета коэффициента скорости оборачиваемости [224] (формула 2.1).

Формула 2.1.

$$K = \frac{Ок + Нс - Рс}{Он + Н + Нс}$$

где:

К - коэффициент скорости движения препарата;

$О_н$, $О_к$ - остатки лекарственного средства на начало и конец изучаемого периода;

Н - поступление препарата за определенный период;

$Н_с$ - среднемесячное поступление препарата;

$Р_с$ - среднемесячная реализация препарата за исследуемый период.

При выполнении работы были использованы контент-анализ, органолептические, физико-химические, микробиологические, биохимические, технологические, фармакологические, морфологические методы исследования.

При проведении исследований использовались химические реактивы и растворители, стандартные образцы, соответствующие требованиям аналитической нормативной документации.

Физико-химическую характеристику сухого экстракта Padus Graynae Maxim и определение содержания в нем основных групп действующих веществ выполняли в соответствии с фармакопейными требованиями и рекомендациями по фитохимическому анализу лекарственного растительного сырья [225, 226, 227].

Изучение содержание рутина, кверцетина и аскорбиновой кислоты в экстракте Padus Grayanae Maxim проводилось методом обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-матричным детектированием на приборе Aligent 1200 (Agilent Technologies, США).

Идентификация и количественное определение хлорогеновой и кофеиновой кислот в сухом экстракте Padus Grayanae Maxim проводились методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе с насосом высокого давления с подачей растворителя от 0,1 до 5,0 $см^3$/мин., обеспечивающим работу в режиме градиентного элюирования, оборудованном спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны и системой для сбора и обработки хроматографических данных.

Определение содержания химических элементов в сухом экстракте Padus Grayanae maxim производили атомно-абсорбционным методом на атомно-эмиссионном спектрометре Optima 5300 DV компании PerkinElmer® с двойным обзором плазмы с двухсегментным твёрдотельным CCD детектором полного волнового диапазона.

В основе метода лежит измерение интенсивности излучения света, испускаемого на определенных длинах волн атомами, возбужденными индуктивно-связанной аргоновой плазмой. Количественное определение связано с количеством испускаемого электромагнитного излучения, качественная информация о составе присутствующих элементов связана с длиной волны испускаемого излучения [228, 229].

Определение сахаров проводилось по способу Бертрана с использованием реактива Фелинга. Метод основан на образовании осадка

окиси меди при кипячении пробы, содержащей сахара, с раствором Фелинга и взвешивании этого осадка [230].

Изучение микробиологической чистоты сухого экстракта Padus Graynae Maxim проводилось в соответствии с требованиями к микробиологической чистоте лекарственных препаратов и субстанций, описанных в ОФС 42-0067-07 Государственной Фармакопеи РФ XII изд. [231].

Доклиническое изучение сухого экстракта Padus Graynae Maxim проводилось в соответствии с «Правилами доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)» [232], «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [233].

Объектом исследования служил сухой экстракт Padus Grayanae maxim, полученный методом лиофильной сушки и стабилизированный лактозы моногидратом (1 часть лактозы / 2 части сухого экстракта Padus Grayanae maxim).

При проведении доклинических исследований в эксперименте были использованы 196 аутбредных крыс и 164 аутбредных мышей обоих полов. Масса тела аутбредных крыс к началу исследования составляла 155 г ± 10%, аутбредных мышей - 20 г ± 10%.

Раствор исследуемого вещества готовили путем растворения необходимой навески в воде очищенной. В случае образования суспензии, раствор перед введением тщательно взбалтывали. Исходя из предельно допустимых объемов вводимой жидкости на одно животное, объем вводимого вещества составлял не более 0,8 мл на 1 мышь, и не более 4 мл на 1 крысу.

При изучении общей токсичности в эксперименте были использованы 196 аутбредных крыс и 124 аутбредных мышей обоих полов.

Острая токсичность. Опыты проводились на 84 интактных белых аутбредных мышах и 84 белых аутбредных крысах, полученных из одного

питомника и прошедших двухнедельный карантин в виварии по месту выполнения исследований.

Перед началом эксперимента животных не кормили в течение 3 часов. Раствор исследуемого вещества вводили однократно, утром, интрагастрально, с помощью зондов.

Хроническая токсичность. Изучение токсичности сухого экстракт Padus Grayanae maxim в условиях хронического эксперимента проводилось на 112 аутбредных крысах массой 125 – 200 г. Животные были разделены на 8 групп:

I – контрольные животные,

II – животные, которым вводился сухой экстракт в дозе 300 мг/кг массы тела в течение 1 месяца;

III – крысы данной группы получали сухой экстракт в дозе 600 мг/кг массы тела в течение 1 месяца;

IV – крысы данной группы получали сухой экстракт в дозе 900 мг/кг массы тела в течение 1 месяца

V - контрольные животные,

VI – животные, получавшие сухой экстракт в дозе 300 мг/кг массы в течение 3 месяцев;

VII – крысы, которым вводился сухой экстракт в дозе 600 мг /кг массы в течение 3 месяцев;

VIII – крысы, которым вводился сухой экстракт в дозе 900 мг /кг массы в течение 3 месяцев.

Изучаемый препарат и вода очищенная вводились крысам в желудок 1 раз в сутки утром за 2 часа до приема пищи с помощью зонда.

При изучении хронической токсичности фитопрепарата учитывались следующие показатели: масса тела животных, общее состояние животных, количество гемоглобина, лейкоцитов, СОЭ, а также некоторые

биохимические показатели, характеризующие состояние углеводного, белкового и липидного обменов.

Мутагенная активность

При изучении мутагенности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim была использована культура клеток из Т-клеточной лимфомы Mus musculus L5178Y, полученная из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки эффективно размножаются в концентрации $2\text{-}9\times10^5$ клеток/см^2, достигая 100 % роста через 2-3 дня культивирования. Затем клетки были субклонированы в лаборатории иммунологии и молекулярной биологии в НЦПП, культура клеток хранится в жидком азоте. В экспериментах с культурой клеток в качестве культуральной среды использовали RPMI-1640 с 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС), 2% L-глутамина, 1% раствора антибиотика-антимикотика. Культивирование клеток осуществляли в CO_2-инкубаторе MCO-20AIC (Sanyo, Япония) при температуре 37°C, 5% CO_2 и 95% влажности. Используемая суспензионная культура клеток L5178Y рекомендована для проведения исследований мутагенности Руководством OECD по испытаниям химических веществ № 487 [234, 235].

Специфическая активность сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Изучение специфической активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim проводили на 80 аутбредных мышах обоего пола массой 20 г ± 10% в два этапа.

Изучение влияния сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на неспецифическую резистентность проводили на экспериментальной модели стафилококковой инфекции, вызванной клиническим изолятом Staphylococcus aureus при введении изучаемого фитоэкстракта по профилактической и лечебной схеме.

Выделение и идентификацию клинического изолята золотистого стафилококка осуществляли по общепринятым методам. Для подтверждения

его вирулентности были использованы реакции плазмокоагулирующей и лецитовителлазной активности [236].

Изучаемый фитоэкстракт экспериментальным животным вводили внутрижелудочно с помощью металлической иглы с оливой.

Противовоспалительная активность сухого экстракта Padus Grayanae Maxim in vitro изучалась по влиянию исследуемого фитоэкстракта на способность индуцировать ИФН-γ и противовоспалительного цитокина IL-4 мононуклеарными клетками человека (МНК).

Выделение мононуклеарной фракции клеток проводили из периферической крови человека. Для определения продукции ИФН-γ и ИЛ-4 суспензию МНК рассеивали в 96-луночные планшеты (BD Falcon, США) в концентрации 105 кл/яч. и инкубировали в CO_2-инкубаторе в течение 24 ч в полной культуральной среде, содержащей различные концентрации сухого экстракта Padus Grayanae Maxim. Культуральной средой являлась 10 % RPMI-1640 (Sigma, США). Негативным контролем во всех экспериментах использовали раствор Хенкса (Sigma, США). По окончании времени инкубации из лунок забирали культуральный супернатант для исследования в нем цитокинов иммуноферментным анализом с использованием коммерческого набора реагентов Альфа – Интерферон (АО «Вектор – Бест», Россия), Гамма – Интерферон (АО «Вектор – Бест», Россия) и IL-4 (R&D Systems, США).

Во всех экспериментах использовали МНК с процентом жизнеспособных клеток больше 90 %. Измерение оптической плотности и расчет концентрации цитокинов производили на микропланшетном ридере Sunrise RC.4 (Tecan, Австрия) с использованием программного обеспечения Magelan 2.0 (Tecan, Австрия) при длине волны 540 нм с референсным фильтром на 620 нм.

Изучение ингибирования продукции IL-1β и TNF-α стимулированных липополисахаридом (LPS) грамотрицательных бактерий МНК при

воздействии сухого экстракта Padus Grayanae Maxim проводили по методу Hougee S. и соавторов [237].

Противоопухолевой активность сухого экстракта Padus Grayanae Maxim in vitro оценивали по цитотоксичности МТТ-методом. Метод основан на использовании водорастворимого витального красителя 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия бромида (МТТ), что позволяет определить жизнеспособность клеточных культур за счет способности живых клеток превращать растворимый желтый МТТ в нерастворимые пурпурно-синие внутриклеточные кристаллы МТТ-формазана. Нежизнеспособные мертвые клетки такой способностью не обладают. После 24-часового воздействия исследуемыми веществами раствор вносили в объеме 20 мкл на ячейку и инкубировали 4 ч в CO_2-инкубаторе при температуре 37 °С, 5 % CO_2 и 95 % влажности. Фотометрическое измерение оптической плотности растворенного формазана, 100 мкл DMSO (Sigma, США), производили на микропланшетном ридере Sunrise RC.4 на длине волны 540 нм. Среднюю цитотоксическую концентрацию исследуемых веществ рассчитывали в программе GraphPad Prism версии 6.00 для Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA).

Антиоксидантная активность сухого экстракта Padus Grayanae Maxim изучалась в серии экспериментов in vitro методом DPPH на спектрофотометре Beckman coulter DU-520 UV-Visible (Scanning Spectrophotometer, США).

В качестве метода оценки антиоксидантной активности использовалась колориметрия свободных радикалов, основанная на реакции DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (C18H12N5O6, M = 394,33), растворенного в этаноле, с образцом антиоксиданта (AH), протекающая по схеме:

$$DPPH^{*} + AH \rightarrow DPPH - H + A^{*}$$

В результате восстановления DPPH антиоксидантом снижается пурпурно-синяя окраска DPPH в этаноле, а реакция контролируется по

изменению оптической плотности обычными методами спектрофотометрии [238, 239, 240].

В качестве препарата сравнения использовался иммуномодулятор растительного происхождения Иммунал (Сандоз д.д. Любляна, Словения).

Морфологические методы исследования

После завершения экспериментов по изучению острой и хронической токсичности животных умерщвляли цервикальной дислокацией.

Животные были подвергнуты полной некропсии с оценкой поверхности тела, мест инъекций, черепной, грудной, брюшной полостей и их содержимого.

Внутренние органы: печень, селезёнку, желудок, кишечник, сердце, почки и легкие фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Из фиксированных органов готовили гистологические препараты, которые окрашивали гематоксилин-эозином и микроскопировали.

Исследование гистологических препаратов проводили при помощи светооптического микроскопа Leica DM LS (Германия) при увеличении 200 и 400. Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры Leica DC320 (Германия).

Статистические методы исследования

Статистическую обработку данных, полученных при проведении технологических, физических, химических, микробиологических исследований проводили общепринятыми методами, изложенными в ГФ СССР X, XI; ГФ РФ XII и Европейской фармакопеи.

Данные доклинических исследований представлены в виде средних значений и их стандартных отклонений. Проверку гипотезы о различии между средними значениями осуществляли общепринятыми статистическими методами с использованием критерия Стьюдента при $p<0,05$ [241] с помощью программного обеспечения Статистика 6.0 (StatSoft Inc, USA).

ГЛАВА 3
АНАЛИЗ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОГО РЫНКА ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ В КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ

Важным элементом для изучения состояния лекарственного обеспечения населения является необходимость маркетинговых исследований фармацевтического рынка ЛП, применяющихся для иммунокоррекции.

Анализ фармацевтического рынка иммуномодуляторов в Кыргызской Республике проводился по номенклатуре, натуральным объемам, производителям, лекарственным формам и оборачиваемости.

Анализ номенклатуры иммуномодуляторов

Как известно, знание номенклатуры лекарственных средств определенной фармако-терапевтической группы является необходимым как один из основных источников информации для фармацевта.

Для того, чтобы получить необходимые данные по выбранной фармакотерапевтической группе «Иммуномодулирующие средства», нами использовался формализованный метод количественного анализа соответствующей документации – контент-анализ.

Проведенный анализ номенклатуры ЛС из группы иммуномодуляторов показал, что на фармацевтическом рынке Кыргызстана к середине 2016 г. было зарегистрировано 32 препарата из группы иммуномодуляторов, из них 14 – брендовые ЛП, в т.ч. 3 ЛС растительного происхождения (Иммунал, Иммунал плюс, Эхинацея); 18 – генерики.

С учетом лекарственных форм, дозировок и разновидностей стандартных упаковок ЛС всего в Кыргызстане зарегистрированы 56 наименований иммуномодуляторов.

Характеристика лекарственных средств из группы иммуномодуляторов по АТХ-классификации

В таблице 3.1 представлен анализ иммуномодуляторов по количеству торговых наименований в каждой подгруппе.

Таблица 3.1 – Распределение иммуномодуляторов по классификации АТХ

Код АТХ, фармакотерапевтическая группа		**Лекарственные препараты**
L03AA	Колониестимулирующие факторы	Максиферон
		Нейпоген
		Тимоген
L03AB	Интерфероны	Белферон
		Генферон
		Интерфераль®
		Альтевир
		Интерферон человеческий лейкоцитарный
		Виферон
L03AC	Интерлейкины	Беталейкин
L03AX	Иммуностимуляторы другие	Анаферон
		Виусид
		Галавит
		Глутоксим
		Иммунал
		Иммуномодулин
		Лиастен
		Ликопид
		Неовир
		Полиоксидоний
		Рибомунил
		Тилтофф
		Уро-Ваксом
		Циклоферон
		Эхинацея и цинк
		Иммунокинд

Таблица 3.2 - Другие лекарственные средства, обладающие иммуномодулирующим действием

Код АТХ		Лекарственные препараты
P02	Противогельминтные препараты	Левамизол
A13A	Общетонизирующие препараты растительного происхождения.	Настойка женьшеня
		Настойка элеутерококка
A13A A11JB	Общетонизирующие препараты растительного происхождения Комбинированные препараты витаминов с другими веществами.	Гинокс
		Теравит тоник
R07AX	ЛП для лечения заболеваний органов дыхания и другие	ИРС 19
J07AX	Другие противобактериальные вакцины	Исмижен
R02AA	Антисептические препараты	Тонзилгон® Н

Согласно данным таблиц 3.1 и 3.2, наибольшую часть ассортимента препаратов, внесенных в Государственный реестр ЛС и разрешенных к медицинскому применению в КР, составляют препараты из группы «L03AX Иммуностимуляторы другие» – представленная 16 торговыми наименованиями ЛС, и группа «L03AB Интерфероны», представленная 6 торговыми наименованиями ЛС.

Следует отметить, что в Перечень жизненно необходимых ЛС КР в редакции 2012 г. включены 3 ЛС из группы иммуномодуляторов под МНН: интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, левамизол, филграстим.

В перечень основных ЛС ВОЗ в редакции 2015 года входят 2 ЛС из группы иммуномодуляторов под МНН: левамизол, филграстим. В перечень основных ЛС ВОЗ для детей (2015 г.) включены также 2 ЛС из группы иммуномодуляторов под МНН: левамизол, филграстим.

Сегментирование рынка иммуномодуляторов в КР по признаку стран-производителей. С целью анализа ассортиментной насыщенности нами проведена дифференциация отечественного рынка иммуномодуляторов по фирмам – производителям иммуномодуляторов по рыночной доле. Установлено, что в структуре поставок по признаку страны – производителя преобладают лекарственные средства из стран ближнего зарубежья – 71,43% и оставшаяся часть - это препараты, произведенные в странах дальнего зарубежья – 28,57% (табл. 3.3).

Таблица 3.3 - Структура поставок иммуномодуляторов по странам – производителям

№ п/п	Страна-производитель	Количество ЛС	
		Всего	Доля, %
Дальнее зарубежье		16	28,57
1	Словения	3	5,36
2	Германия	3	5,36
3	Китай	3	5,36
4	Франция	2	3,57
5	Швейцария	2	3,57
6	Румыния	2	3,57
7	Испания	1	1,79
Ближнее зарубежье		40	71,43
1	Россия	34	60,71
2	Грузия	3	5,36
3	Украина	2	3,57
4	Узбекистан	1	1,79

Анализ ассортимента по странам-производителям показал, что всего в ДЛО и МТ МЗ КР зарегистрированы препараты, произведенные в 11-и странах. Среди них по количеству ЛП первое место занимает Россия – 60,71% (34 ЛП), второе - Словения, Грузия, Германия и Китай – по 5,36% (по 3 ЛП). Иммуномодулирующие препараты поставляются также из Франции, Швейцарии, Румынии, Испании, Украина и Узбекистана (рис. 3.1).

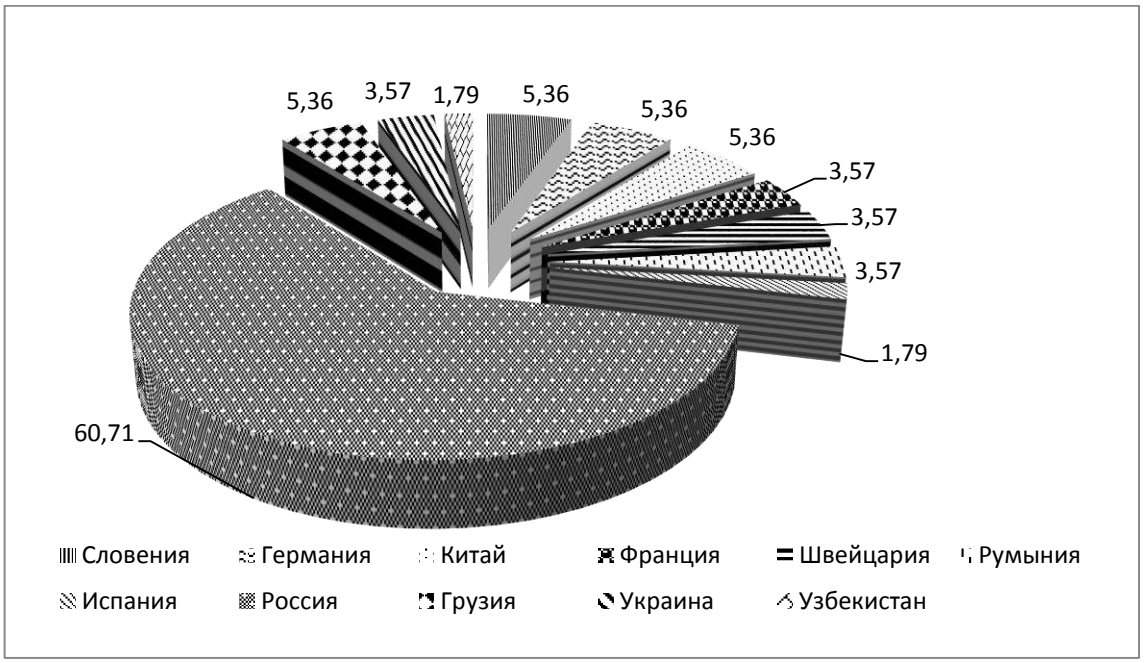


Рис 3.1. Структура поставок (в %) иммуномодуляторов на фармацевтический рынок Кыргызстана по странам-производителям

Сегментирование фармрынка иммуномодуляторов в КР по лекарственным формам. Анализ лекарственных форм иммуномодуляторов, представленных на фармацевтическом рынке КР (табл. 3.4), показал, что 26,79% зарегистрированных торговых наименований иммуномодуляторов представлены в форме таблеток, 23,21% - растворы, лиофилизаты – 10,71%, суппозитории – 8,93%, порошки - 7,14%, капсулы – 7,14, спреи и капли – по 5,66%, мази – 3,57% и драже -1,89%.

Как видно из таблицы 3.4, среди других твердых лекарственных форм иммуномодуляторов на фармацевтическом рынке КР преобладают таблетированные лекарственные формы.

Таблица 3.4 - Структура иммуномодуляторов по лекарственным формам

Лекарственные формы	Количество	%
Твердые		
Драже	1	1,79
Таблетки	15	26,79
Капсулы	4	7,14
Порошки	4	7,14
Лиофилизаты	6	10,71
Итого	**30**	**53,57**
Мягкие		
Мази	2	3,57
Суппозитории	5	8,93
Итого	**7**	**12,50**
Жидкие		
Спрей	3	5,36
Капли	3	5,36
Итого	**6**	**10,71**
Лекарственные средства для инъекций		
Растворы	13	23,21
Итого	**13**	**23,21**
Всего	**56**	**100**

Ценовая сегментация фармрынка иммуномодуляторов в КР

Как известно, для анализа конкуренции в рамках нозологических сегментов необходима ценовая сегментация. Это обусловлено следующими базовыми факторами «покупательской» психологии и соответствующей сегментации потребителей. Достаточно значительная часть покупателей лекарств имеет очень низкий уровень доходов, и поэтому при покупке лекарств в аптеке всегда выбирает препараты с минимальной стоимостью. Основная масса покупателей по большинству позиций при наличии альтернатив избегает покупать самые дешевые варианты и, надеясь на

лучший вариант по критерию «цена/качество», старается держаться некоего «среднего» ценового диапазона.

Большинство относительно обеспеченной части населения при покупке зачастую выбирает достаточно дорогие (или даже наиболее дорогие), преимущественно импортные препараты, стараясь не экономить на здоровье и считая, что цена лекарств более или менее пропорциональна их качеству.

При анализе ценовой сегментации иммуномодуляторов изучали среднюю оптовую цену 1 условной упаковки иммуномодулятора. За 1 условную упаковку принимали 10 ед. лекарственной формы.

Таблица 3.5 - Ценовая сегментация иммуномодуляторов по торговым наименованиям

Таблетки		
Торговое наименование	**Дозировка**	**Оптовая цена на 10 таблеток иммуномодулятора (сом)**
Иммунал®	80 мг	133
Полиоксидоний®	12 мг	1382
Рибомунил	0,75мг	1129
Анаферон (взрослый)	аффинно-очищенные антитела к гамма - интерферону человека (комбинация гомеопатических разведений С12, С30 и С200) 3мг	108
Исмижен®	7 мг	479
Максиферон	0,15 г	452
Циклоферон®	150 мг	273
Капсулы		
Торговое наименование	**Дозировка**	**Оптовая цена на 10 капсул иммуномодулятора (сом)**
Тилтофф	100 мг	249
Эхинацея и цинк	600 мг	30

Суппозитории		
Торговое наименование	**Дозировка**	**Оптовая цена на 10 суппозитории иммуномодулятора (сом)**
Галавит	100 мг	1100
Генферон®	55мг+500 000МЕ+10мг	560
Генферон®	55мг+1 000 000 МЕ+10мг	815
Генферон® Лайт	125 000 МЕ+5мг	455
Генферон® Лайт	250 000 МЕ+5мг	445,5
Флаконы		
Торговое наименование	**Дозировка**	**Оптовая цена на 10 флаконов иммуномодулятора (сом)**
Альтевир	3 млн. МЕ/мл	2800
Альтевир	1 млн.МЕ/мл	2446
Альтевир	5 млн.МЕ/мл	3110
Глутоксим®	10 мг/мл 1 мл	1726
Глутоксим®	10 мг/мл 2 мл	2442
Глутоксим®	30мг/мл 1 мл	2708
Глутоксим®	30 мг/мл 2мл	3894
Иммуномодулин	0,01% 1мл	295
Нейпоген®	30 млн ЕД/0,5 мл	8950
Неовир®	250 мг/2 мл	3250
Тимоген®	100 мкг/мл	925
Циклоферон®	125 мг/мл	828

Ценовая сегментация иммуномодулирующих препаратов проводилась под торговыми наименованиями в ценах конечного потребителя (розничные цены) для трех форм выпуска:

- препараты для перорального применения (таблетки, капсулы) - их доля среди зарегистрированных в КР торговых наименований иммуномодуляторов составила 26,79%;
- мягкие лекарственные формы (суппозитории), составляющие 8,93% зарегистрированных в КР торговых наименований иммуномодуляторов;
- препараты для парентерального применения (растворы для инъекций, лиофилизированные порошки и порошки для приготовления растворов), составляющие 33,92% зарегистрированных в КР торговых наименований иммуномодуляторов.

Все препараты были условно разбиты на 3 ценовых сегмента.

В сегмент ЛС со стоимостью до 500 сом (7,5$) за условную упаковку вошли 10 препаратов, 7 из них были представлены твердыми лекарственными формами. Средняя стоимость условной упаковки составила 187 сом (2,8$).

В сегмент препаратов с ценой от 500 до 1500 сом (7,5$ - 22,5$) за условную упаковку вошло 7 торговых наименований. В этом сегменте были представлены твердые, мягкие и жидкие лекарственные формы примерно в равных долях. Средняя стоимость условной упаковки в этом сегменте составила 845 сом (12,6$).

Сегмент дорогих препаратов со средней ценой 3480 сом (более 50$) за условную упаковку был представлен 9 препаратами для парентерального применения [242].

Анализ оборачиваемости иммуномодуляторов. От адекватного насыщения фармацевтического рынка иммуномодулирующими препаратами во многом зависит своевременность и успех лечения многих заболеваний, связанных с нарушениями функции иммунной системы.

С целью объективной оценки потребления препаратов-иммуномодуляторов нами установлены коэффициенты скорости движения их в аптеках г. Бишкека (табл. 3.6).

Таблица 3.6. - Коэффициенты оборачиваемости препаратов - иммуномодуляторов в аптеках г. Бишкек

№	Наименование и форма выпуска лекарственного препарата	Коэффициент скорости оборачиваемости
1	Альтевир 3млн МЕ/мл №5 амп.	0,06
2	Альтевир 3млн МЕ/мл шприц-тюбик	0,00
3	Анаферон №20 табл.	0,15
4	Галавит 100мг №10 супп.	0,33
5	Галавит 100мг №5 порошок для инъекций	0,5
6	Галавит 25мг №20 табл.	0,45
7	Генферон 1млн.МЕ №10 супп.	0,27
8	Генферон 500тыс.МЕ №10 супп.	0,15
9	Генферон ЛАЙТ 125тыс.МЕ №10 супп.	0,08
10	Генферон лайт 50тыс.МЕ назальный спрей	0,19
11	Иммунал 50мл капли	0,08
12	Иммунал 80мг №20 табл.	0,05
13	Интерферон №10 амп.	0,46
14	ИРС-19 20мл назальный спрей	0,11
15	Исмижен 7мг №10 табл.	0,13
16	Исмижен 7мг №30 табл.	0,17
17	Максиферон 0,15г №10 табл. (БАТФЕРОН)	0,13
18	Полиоксидоний 12мг №10 табл.	0,01
19	Рибомунил 0,75мг №4 табл.	0,00
20	Уро Ваксом 6мг №30 капс.	0,08
21	Циклоферон 125мг 2мл №5 р-р для инъекций	0,13
22	Циклоферон 150мг №10 табл.	0,15

Как известно, в зависимости от показателя коэффициента скорости оборачиваемости ЛП подразделяются на 3 группы:

1. Препараты с замедленной скоростью движения ($0,5 < К < 1,0$).
2. Препараты с постоянной скоростью движения ($0,26 < К < 0,49$).
3. Препараты с высокой скоростью движения ($0 < К < 0,25$).

Как видно из таблицы 3.6, среди лекарственных средств из группы иммуномодуляторов нет препаратов, относящихся к средствам с замедленной скоростью движения. Лекарственные средства «Галавит», «Интерферон человеческий» относятся к препаратам с постоянной скоростью движения. Все остальные иммуномодулирующие средства, включенные в анализ, имеют коэффициент оборачиваемости К < 0,25 и относятся к препаратам с высокой скоростью движения. Препараты Альтевир, Рибомунил, Полиоксидоний, Иммунал, Генферон Лайт имеют коэффициент оборачиваемости К < 0,1, что свидетельствует о высоком спросе на данные препараты.

Из представленных данных следует, что аптеки имеют устоявшийся ассортимент препаратов данной группы. При этом отмечается незначительная насыщенность иммуномодуляторами аптечного сектора по сравнению с общим количеством зарегистрированных в стране иммуномодулирующих средств: в аптеках имеется в продаже только около 50% от зарегистрированных в Кыргызстане препаратов из группы иммуномодуляторов. Постоянный спрос и стабильная доходность характерна для 5 препаратов [243].

Заключение по 3 главе.

На фармацевтическом рынке КР наибольшую часть ассортимента иммуномодуляторов составляют группа «L03AX Иммуностимуляторы другие» – представленная 16 торговым наименованием ЛС, и группа «L03AB Интерфероны», представленная 6 торговыми наименованиями ЛС.

В структуре поставок иммуномодуляторов лидирующую позицию занимает Россия (60,71%). Наибольший удельный вес среди иммуномодуляторов на фармацевтическом рынке КР принадлежит твердым лекарственным формам (53,57%).

Наиболее экономически доступные иммуномодуляторы на фармрынке Кыргызской Республики представлены твердыми лекарственными формами.

Кыргызстанский рынок фармацевтических препаратов недостаточно насыщен препаратами-иммуномодуляторами: в аптеках имеется в продаже только около 50% от зарегистрированных в Кыргызстане препаратов из группы иммуномодуляторов.

Аптеки имеют устоявшийся ассортимент иммуномодуляторов, большая часть из них относится к препаратам с высокой скоростью движения. Постоянный спрос и стабильная доходность характерна для 5 препаратов (Альтевир, Рибомунил, Полиоксидоний, Иммунал, Генферон Лайт).

Полученные данные позволяют констатировать, что для фирм, поставляющих ЛС на рынок Кыргызстана, существует возможность ввоза новых препаратов, регулирующих иммунитет. Особое значение приобретает разработка и внедрение иммуномодуляторов растительного происхождения с учетом практических возможностей и наличия сырьевых запасов в КР, позволяющих решить проблемы импортозамещения.

ГЛАВА 4.
РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА PADUS GRAYANAE MAXIM И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ

В настоящее время перспективным направлением в области создания фитопрепаратов является производство сухих экстрактов. Сухие экстракты являются наиболее рациональным типом экстрактов. Они удобны в использовании, имеют минимальную массу, содержат балластных веществ меньше, чем жидкие, они более транспортабельны.

Сухие экстракты применяются в виде растворимых чаев, а также они служат основой для получения различных лекарственных форм, содержащих поливалентный набор биологически активных веществ, полученных из растительного лекарственного сырья в их естественной композиции [244].

4.1. Получение сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Технология стандартизованных экстрактов предусматривает те же стадии, что и общая схема получения экстрактов, а именно: экстрагирование лекарственного растительного сырья, очистка извлечения, выпаривание и сушка, стандартизация.

Способ получения экстракта сухого из надземных частей Padus Grayanae Maxim включает следующие основные стадии технологического процесса.

1. Подготовка сырья:
   - определение доброкачественности сырья;
   - измельчение сырья до частиц размером 1-3 мм;

2. Получение водно-спиртового экстракта.
3. Фильтрация.
4. Упаривание водно-спиртового экстракта.
5. Сушка.
6. Стабилизация полученного сухого экстракта.

Подготовка сырья

Доброкачественность растительного сырья – надземных частей Padus Grayanae Maxim, проверялась по параметрам внешнего вида, содержания примесей и влажности. Затем растительное сырье измельчалось в дробилке до примерных размеров частиц 1-3 мм. Для получения водно-спиртового извлечения использовалось измельченное растительное сырье, проходящее через сито размером ячеек 7 мм.

Получение водно-спиртового экстракта

Процесс экстракции производили при экспериментально установленном соотношении сырьё / экстрагент 1:10 при температуре 20°-22°С.

Для получения водно-спиртового экстракта из надземных частей Padus Grayanae Maxim, растительное сырье, предварительно проверенное на доброкачественность, в количестве 1000 г отвешивалось на лабораторных весах, затем помещалось в мацерационный бак.

Из этанола 96,2% и воды очищенной готовили водно-спиртовой раствор в концентрации этанола 40%. Отмеряли 10,0 л приготовленного раствора и помещали в мацерационный бак сверху подготовленного растительного сырья до зеркала. Бак герметично закрывали и ставили в темное место для мацерации на 7 суток. По истечении 7 суток, полученное водно-спиртовое извлечение отфильтровывали через марлю медицинскую, сложенную в шесть слоев, в сборник объемом 10 л и ставили в холодильник на 2 сутки для отстаивания.

После отстаивания, полученное водно-спиртовое извлечение декантировали в другой сборник объемом 10 л и измерили объем полученного извлечения, который составил 8,3 л. Были измерены содержание этанола в извлечении и сухой остаток, которые составили соответственно 36,5% и 2,35%.

Сборник герметично закрыли и поставили в темное место при комнатной температуре для дальнейшего хранения.

Упаривание водно-спиртового извлечения

Полученное водно-спиртовое извлечение Padus Grayanae maxim подвергали упариванию порциями в ротационном испарителе “Hei-Vap” в комплекте (Heidolph, Германия), при температуре 75°С, при подключенном вакуумном насосе, создавая разрежение над упариваемым извлечения, собирая упаренное извлечение в сборник объемом 5 л. Общее количество сгущенного жидкого экстракта Padus Grayanae maxim составило 3,3 л, таким образом, уменьшение объема водно-спиртового извлечения Padus Grayanae maxim при упаривании составило около 2,5 раз. Далее сгущенный водно-спиртовой экстракт подвергался лиофильной сушке.

Сушка

Для дальнейшей сушки сгущенного жидкого водно-спирттового извлечения Padus Grayanae maxim использовалась лиофильная сушилка ЛС 1000 (Проинтех, г. Пущино, Россия). Сгущенный экстракт заливался в лотки слоем толщиной 10 мм и замораживался в морозильной камере при температуре -25°С в течение 24 часов. Замороженный материал загружался в камеру лиофильной сушилки. Сушка проводилась при температуре сублиматора -48-52°С, давления в вакуумной камере составляло 4,20-7,62 Па в течение 24 часов.

Выход сухой субстанции из сгущенного водно-спитртового извлечения Padus Grayanae maxim составлял от 6 до 7%.

Рис. 4.1.1. Получение сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Материальный баланс стадии получения водно-спиртового извлечения Padus Grayanae Maxim

Израсходовано		Получено	
Наименование исходных материалов	**Количество, кг**	**Наименование конечного продукта, отходов и потерь**	**Количество, кг**
Листьев Padus Grayanae Maxim	1,0	Водно-спиртовое извлечение Padus Grayanae Maxim (36,5%)	7,78
Спирт этиловый 40%	9,352	Спирт-рекуперат 20%	2,8
Вода очищенная	3,0	Потери (общие)	2,772
ИТОГО	**13,352**	**ИТОГО**	**13,352**

Примечание:

1. количество полученного водно-спиртового извлечения 8,3 л, плотность – 0,9375, масса 8,3х0,9375=7,78 кг;
2. плотность спирта этилового 40% - 0,9352, масса 10 л спирта этилового 40% 10х0,9352=9,352 кг;
3. количество полученного спирта-рекуперата 2,9 л, плотность 0,9655, масса спирта-рекуперата 2,9х0,9655=2,8 кг

Материальный баланс стадии получения сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Израсходовано		Получено	
Наименование исходных материалов	**Количество, кг**	**Наименование конечного продукта, отходов и потерь**	**Количество, кг**
Водно-спиртовое извлечение Padus Grayanae Maxim (36,5%)	7,78	Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim	0,194
		Спирт-отгон %	4,461
		Потери (общие)	3,125
ИТОГО	**7,78**	**ИТОГО**	**7,78**

Примечание:

1) количество водно-спиртового извлечения 8,3 л, плотность – 0,9375, масса 8,3х0,9375=7,78 кг;
2) сгущенное водно-спиртовое извлечение 3,3 л, количество спирта-отгона 8,3-3,3=5 л;
3) плотность спирта-отгона – 0,8922, масса 5 л спирта-отгона 5х0,8922=4,461 кг

Стабилизация полученного сухого экстракта

К недостаткам сухих экстрактов относится их высокая гигроскопичность, вследствие которой они могут образовывать комкообразные массы, утрачивающие сыпучесть.

Полученный путем лиофильной сушки сухой экстракт Padus Grayanae maxim был исследован на предмет гигроскопичности в соответствии с

монографией 5.11 (Гигроскопичность) Европейской Фармакопеи 6-го издания [227]. По полученным результатам сухой экстракт Padus Grayanae maxim является гигроскопичным.

Для стабилизации по показателю гигроскопичности и обеспечения сыпучести, в соответствии с рекомендацией статьи (Экстракты) ГФ СССР X издания [225], к полученному сухому экстракту Padus Grayanae maxim был добавлен лактозы моногидрат (молочный сахар). По данным экспериментальных испытаний на гигроскопичность было установлено оптимальное соотношение лиофилизированного сухого экстракта Padus Grayanae maxim и лактозы 1:2 соответственно [245].

4.2. Изучение биологически активных веществ сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Сложной проблемой на пути создания растительных ЛС является выделение действующих веществ, поскольку природные объекты представляют собой сложные многокомпонентные системы, зачастую трудно поддающиеся разделению. Однако изолирование и установление строения или идентификация соединений, обусловливающих специфическую активность фитопрепаратов, помимо важного научного значения имеет еще прикладной характер, так как это необходимо для последующей стандартизации ЛС.

4.2.1. Определение содержания флавоноидов и аскорбиновой кислоты в экстракте Padus Grayanae Maxim

Условия хроматографического анализа рутина и аскорбиновой кислоты: колонка: Zorbax Eclipse C18 5мкм. 250×4,6 мм; подвижная фаза: ацетонитрил – водный раствор трифторуксусной кислоты с pH 2,7 (20:80); скорость подвижной фазы: 1,0 $см^3$/мин; температура колонки: 25°C; детектирование: УФ, ƛ=240 и 360 нм. Объем вводимой пробы: 10 $мм^3$.

При проведении исследований были использованы следующие стандарты: рутина, кверцетина и аскорбиновой кислоты.

Приготовление стандартного образца рутина. Для приготовления стандартного образца рутина с концентрацией 10 мг/л (ppm) взвесили 0,05 г рутина и поместили в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, довели объем до метки метанолом. Из полученного раствора взяли аликвоту 0,5 мл и поместили в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, довели объем до метки метанолом. Растворы фильтровали через мембранный фильтр с диаметром 0,2 мкм и использовали для проведения анализа.

Приготовление стандартного образца аскорбиновой кислоты. Для приготовления стандартного образца аскорбиновой кислоты с концентрацией 10 мг/л (ppm) взвесили 0,05 г аскорбиновой кислоты и поместили в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, довели объем до метки этанолом. Из полученного раствора взяли аликвоту 0,5 мл и поместили в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, довели объем до метки этанолом. Растворы фильтровали через мембранный фильтр с диаметром 0,2 мкм и использовали для проведения анализа.

Подготовка пробы для анализа. Экстракт Padus Grayanae Maxim поместили на 20 минут в ультразвуковую баню. Затем пробу для ВЭЖХ анализа фильтровали через мембранный фильтр с диаметром 0,2 мкм и использовали для проведения анализа.

Условия хроматографического анализа кверцетина: колонка: Zorbax Eclipse C18 5мкм. 250×4,6 мм; подвижная фаза: ацетонитрил – водный раствор трифторуксусной кислоты с pH 2,7 (30:70); скорость подвижной фазы: 1,0 $см^3$/мин; температура колонки: 25°C; детектирование: УФ, λ=360нм. Объем вводимой пробы: 10 $мм^3$.

Приготовление стандартного образца кверцетина. Для приготовления стандартного образца кверцетина с концентрацией 10 мг/л (ppm) взвесили 0,05 г кверцетина и поместили в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, довели объем до метки метанолом. Из полученного раствора взяли аликвоту 0,5 мл и

поместили в мерную колбу вместимостью 50 $см^3$, довели объем до метки метанолом. Растворы фильтровали через мембранный фильтр с диаметром 0,2 мкм и использовали для проведения анализа.

Идентификация. Времена удерживания (Rt) основных пиков на хроматограммах испытуемого и стандартного образцов совпадают. Установлено, что для стандартного образца рутина Rt = 5,654 мин., а в испытуемом образце время удержания рутина составило Rt = 5,348 мин. Отклонение составило 0,4% (допустимое отклонение ±2%) (рис. 4.2.1.1).

Rt стандартного образца кверцетина составило 10,854 мин., а Rt кверцитина в испытуемом образце составило 10,960 мин. Отклонение составило 0,96% (допустимое отклонение ±2%) (рис. 4.2.1.2).

Для стандартного образца аскорбиновой кислоты Rt = 2,198 мин., а в испытуемом образце - Rt = 2,219 мин. Отклонение составляет 0,94% (допустимое отклонение ±2%) (рис. 4.2.1.3).

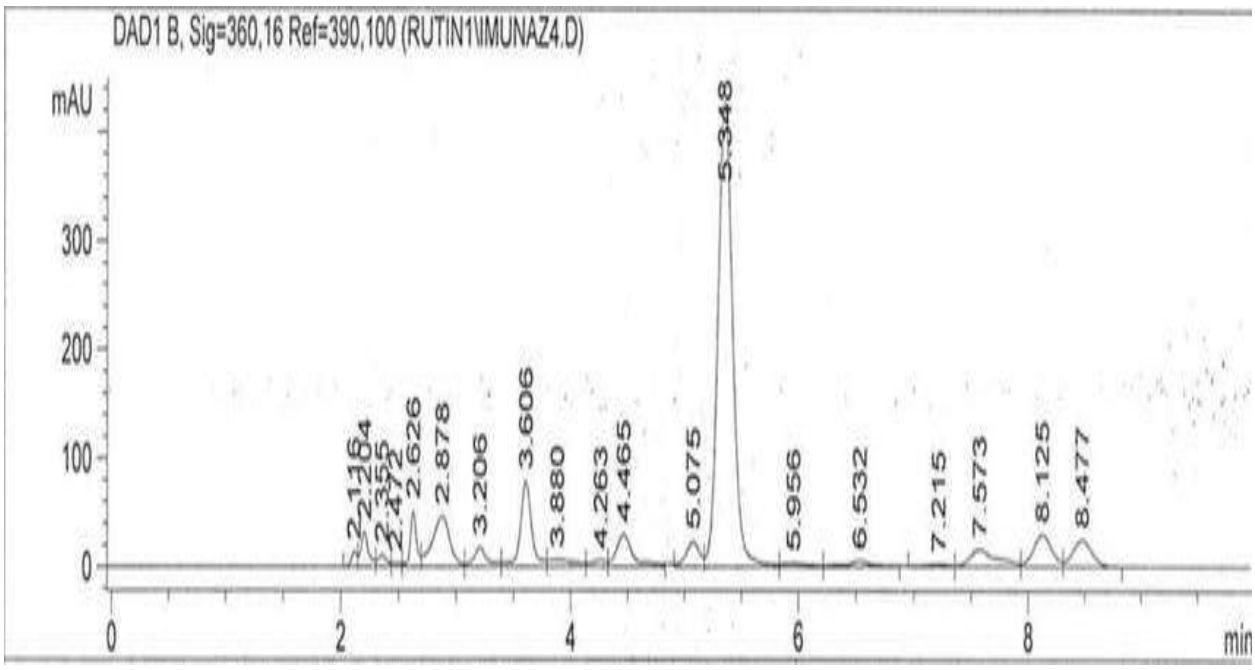


Рис. 4.2.1.1. Хроматограмма ВЭЖХ рутина в экстракте Padus Grayanae Maxim

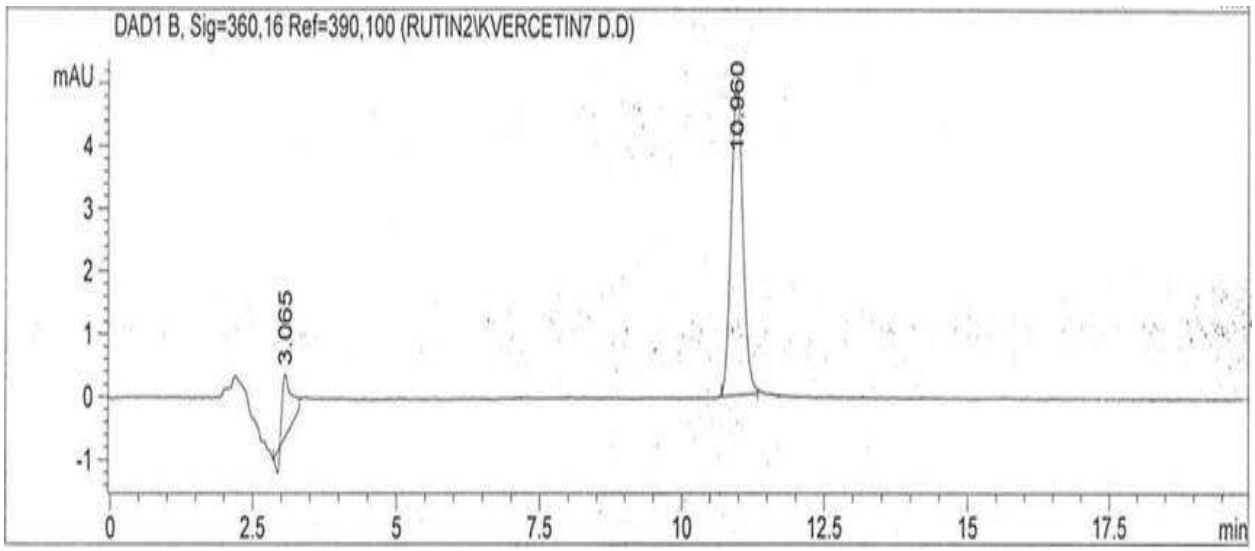


Рис. 4.2.1.2. Хроматограмма ВЭЖХ кверцетина в экстракте Padus Grayanae Maxim

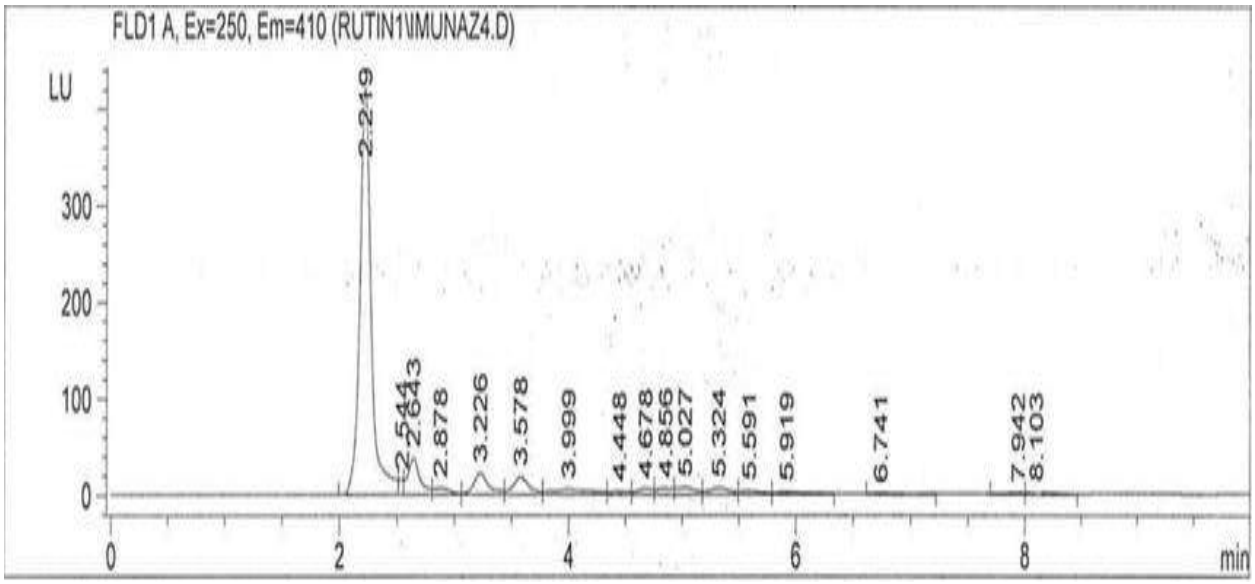


Рис. 4.2.1.3. Хроматограмма ВЭЖХ аскорбиновой кислоты в экстракте Padus Grayanae Maxim

Расчет содержания компонентов осуществляли по формуле 4.1:

Формула 4.1.

$$C_ч = C(SI / S2)$$

где:

C - концентрация соответствующего стандартного раствора, мг/см^3;

S1 - площадь пика определяемого компонента в анализируемой пробе;

S2 - площадь пика определяемого компонента в стандартном образце.

Проведенное исследование в соответствии с результатами анализа выявило количественное содержание в образцах сухого экстракта Padus Grayanae Maxim рутина - 5,96±0,01 мг/г; кверцетина - 3,24±0,01 мг/г; аскорбиновой кислоты - 19,17± 0,02 мг/г.

Методика идентификации и установленные количественные параметры содержания флавоноидов и аскорбиновой кислоты в экстракте Padus Grayanae Maxim могут быть использованы при разработке НД для ГЛФ сухого экстракта Padus Grayanae Maxim [246].

4.2.2. Определение содержания хлорогеновой и кофейной кислот в экстракте Padus Grayanae Maxim

Анализ проводили на жидкостном хроматографе с насосом высокого давления с подачей растворителя от 0,1 до 5,0 $см^3$/мин., обеспечивающим работу в режиме градиентного элюирования, оборудованном спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны и системой для сбора и обработки хроматографических данных.

Подготовка образца

1 г сухого экстракта Padus Grayanae Maxim помещают в плоскодонную колбу, добавляют 50 $см^3$ 50 %-ного этилового спирта, смесь нагревают на водяной бане при 55-60°С в течении 30 мин. Экстракцию повторяют пятикратно. Спиртовые экстракты, охлаждают, фильтруют и доводят объем до 250 $см^3$ 50 %-ным этанолом.

Условия хроматографического разделения: колонка Zorbax ODS, 5 мкм, 250 х 4,6 мм; предколонка – ODS, 5 мкм, 20 х 4,6 мм; объем инъекции 20 мкл; подвижная фаза: смешивается метанол и 1,5% уксусная кислота в соотношении от 20:80 до 40:60 в течение 60 минут. скорость потока: 1$см^3$/мин; температура колонки - 45°С длина волны: 275 нм.

Приготовление раствора стандартного образца. Навески стандартного образца хлорогеновой и кофейной кислот растворяют в 50 %

растворе этанола с помощью ультразвуковой бани в течение 5 минут. Концентрация раствора кофейной и хлорогеновой кислот в растворе - 0,1 мг/мл.

Приготовление подвижной фазы: 7,1 мл ледяной уксусной кислоты наливаем в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводим до метки водой для ВЭЖХ и перемешиваем.

Идентификация. Времена удерживания (Rt) основных пиков на хроматограммах испытуемого и стандартного образцов совпадают.

Rt стандартного образца кофейной кислоты составило 12,395 мин., а Rt кофейной кислоты в испытуемом образце - 12,349 мин. Отклонение составляет 0,4% (допустимое отклонение ±2%) (рис. 4.2.2.1 и 4.2.2.3).

Rt стандартного образца хлорогеновой кислоты было равно 10,350 мин., а Rt хлорогеновой кислоты в испытуемом образце составило 10,230 мин. Отклонение составляет 1,15% (допустимое отклонение ±2%) (рис. 4.2.2.2 и 4.2.2.3).

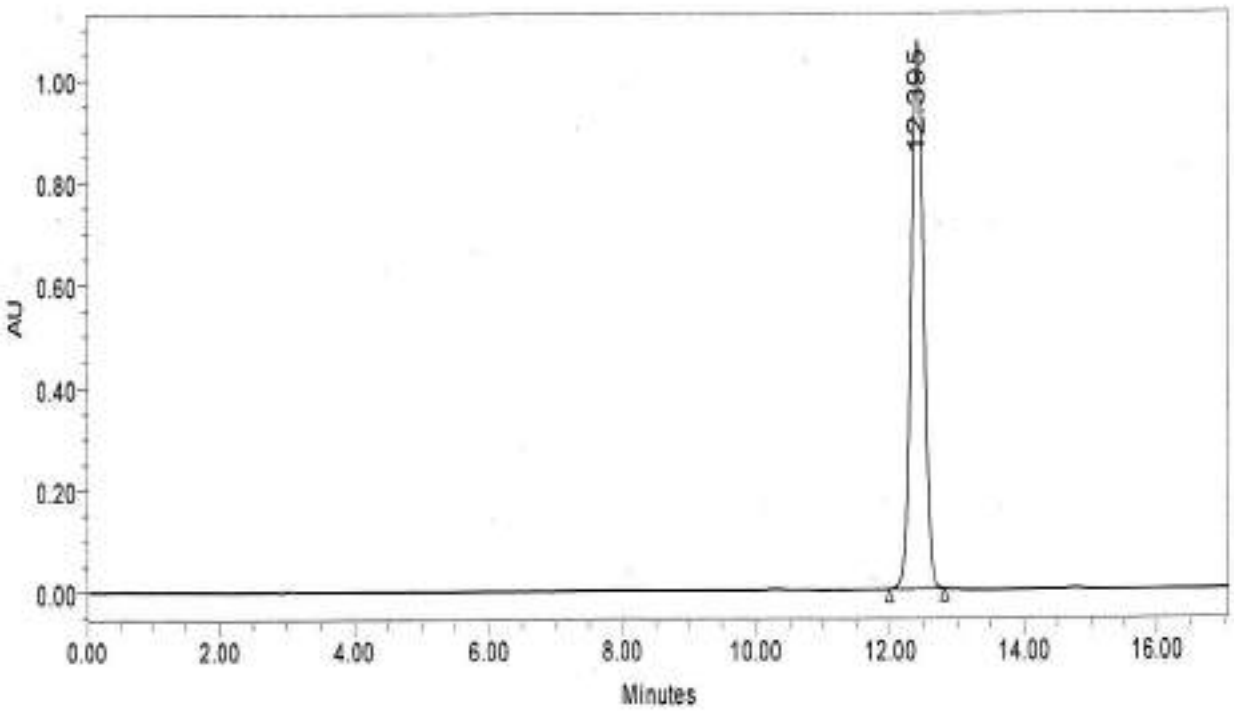


Рис. 4.2.2.1. Хроматограмма стандартного образца кофейной кислоты

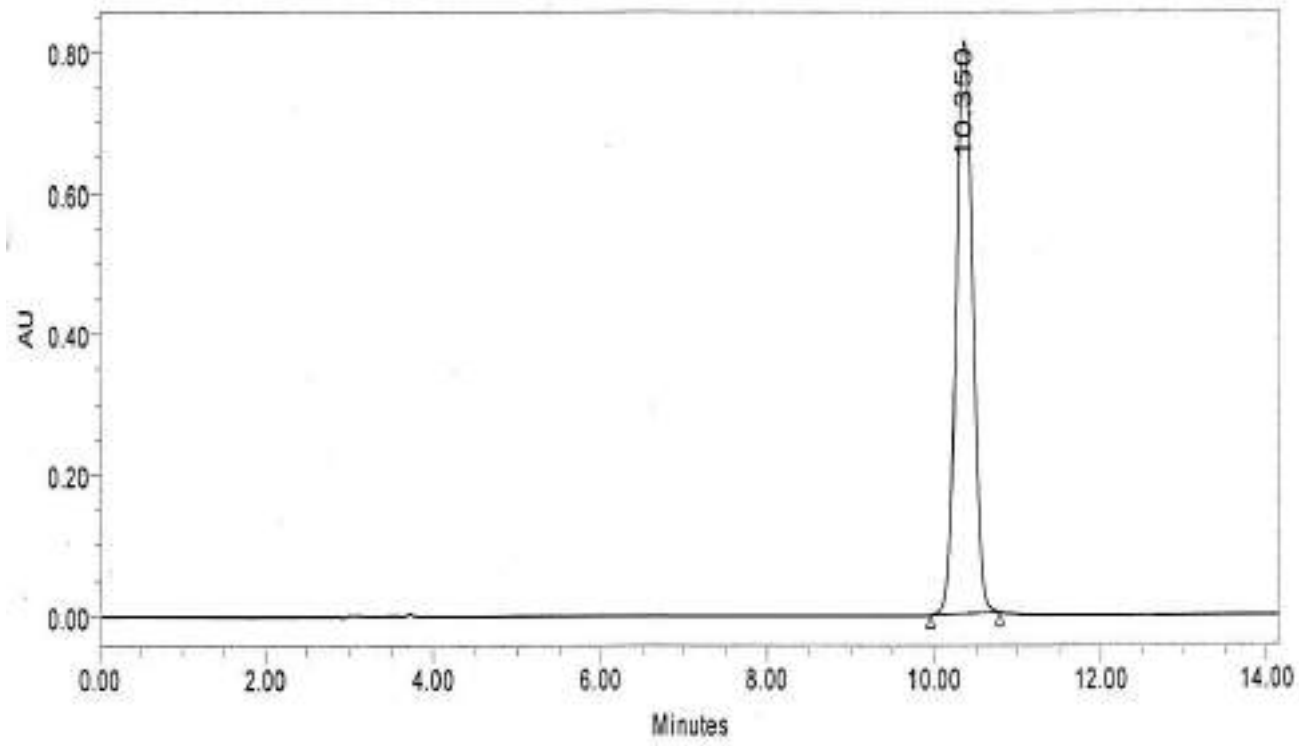


Рис. 4.2.2.2. Хроматограмма стандартного образца хлорогеновой кислоты

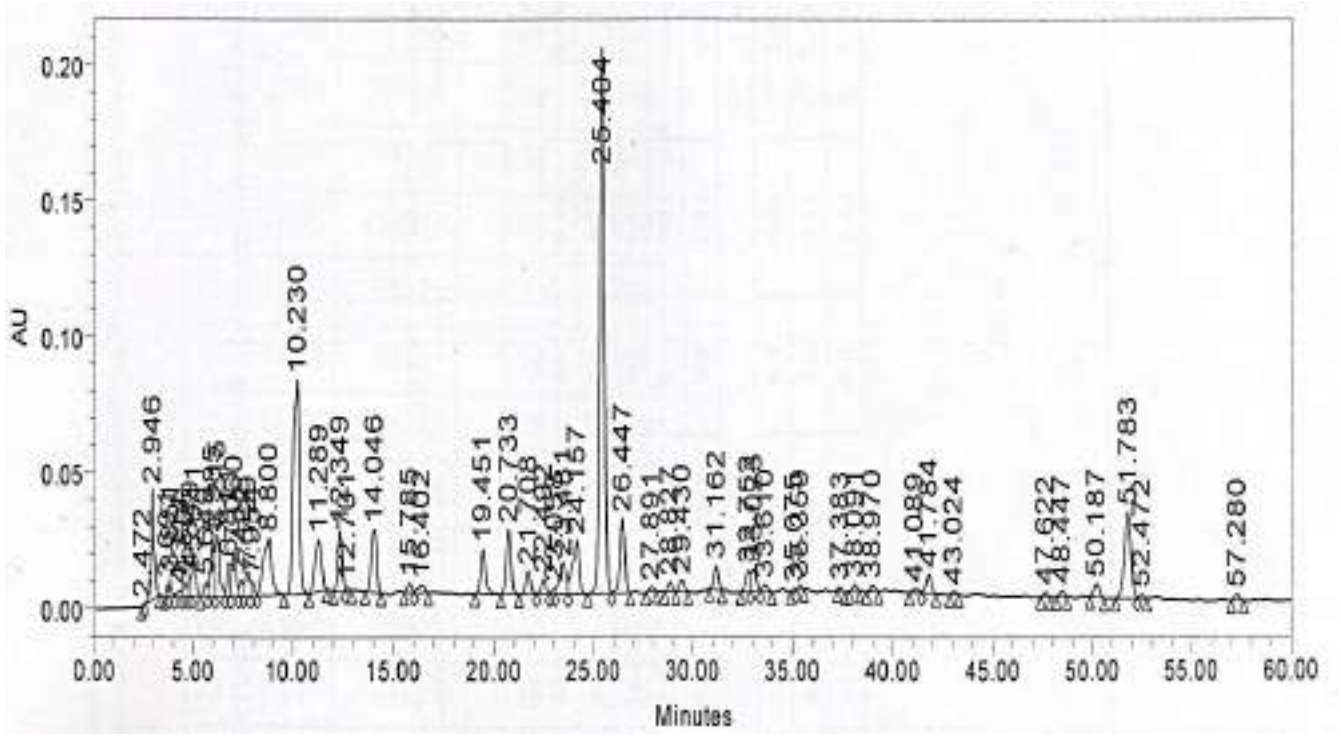


Рис. 4.2.2.3. Хроматограмма истыпутаего обраца экстракта

Padus Grayanae Maxim

Результаты исследований также показали, что раствор изучаемого препарата содержит многочисленные пики, характерные для растительных экстрактов. Содержание действующих веществ вычисляют по формуле 4.2.

Формула 4.2.

$$X = \frac{S_1 * \ m_0 * V_1 * P * 100}{S_0 * V_0 * \ m_1 * 100 * (100 - W)}$$

где:
S_1 = площадь основного пика на хроматограмме испытуемого образца;
S_0 = площадь основного пика на хроматограмме стандартного образца;
m_1 - масса навески препарата, в миллиграммах;
m_0 - масса навески стандартного образца, в миллиграммах;
V_1 – объем разведения испытуемого образца, в миллилитрах;
V_0 – объем разведения стандартного образца, в миллилитрах;
P - чистота стандартного образца, в процентах;
W – содержание влаги в испытуемом образце, в процентах

В результате проведенных исследований было установлено, что в образцах сухого экстракте Padus Grayanae Maxim содержится: хлорогеновая кислота - 10,7 ± 0,018 мг/г; кофейная кислота – 0,95 ± 0,007 мг/г. [247].

4.2.3. Определение содержания моно-, олиго- и полисахаридов в сухом экстракте Padus Grayanae Maxim

Для определения моно-, олигосахаридов навеску (1г) сухого экстракта из надземных частей Padus Grayanae Maxim помещали в круглодонную колбу емкостью 100 мл, снабженную обратным холодильником, туда же добавили 100 мл 96% -ного этанола и поместили в водяную баню. Смесь кипятили в течение 30 минут, затем отфильтровали через воронку Бюхнера.

Определение моносахаридов

Полученный спиртовый раствор сгущали под вакуумом до полного удаления этанола. Оставшийся экстракт перенесли в мерную колбу емкостью 100 мл, довели объем до метки дистиллированной водой. Для определения моносахаридов из полученного раствора взяли 10 мл пробы

в коническую колбу для титрования емкостью 100 мл, добавили по 10 мл растворы Фелинга I и II (растворы готовили заранее), туда же добавили 20 мл дистиллированной воды. Смесь осторожно, в течение 3 минут, довели до кипения и кипятили в течение двух минут. По окончании кипячения колбу быстро охладили под струей холодной воды до 22 ºС, затем прибавили 10 мл 30% -ного раствора йодистого калия и 10 мл 25%-ного раствора серной кислоты и сразу же титровали при непрерывном перемешивании 0,1 н. раствором тиосульфата натрия до перехода коричневой окраски в желтую. Затем к смеси прибавили 10 мл 1% ного раствора крахмала и медленно дотитровали раствор до перехода синей окраски в кремовую, присущую йодиду меди.

Паралельно в тех же условиях, но без добавления исследуемого фитоэкстракта, проводили контрольный опыт. По разности объемов раствора тиосульфата натрия, израсходованных на титрование контрольного и испытуемого опыта, находили объем раствора тиосульфата натрия, который соответствует количеству образовавшейся при анализе восстановленной меди.

Содержание глюкозы в милллиграмах находили по таблице [230], учитывая, что 1 мл 0,1 н. раствора тиосульфата натрия соответствует 6,4 мг восстановленной меди. Содержание глюкозы в пересчете на абсолютно сухой экстракт в процентах вычисляли по формуле 4.3:

Формула 4.3.

$$X = \frac{а \cdot 100 \cdot 100\%}{б \cdot г}$$

где:
а – количество глюкозы, найденное по таблице, мг;
100 – разбавление раствора, мл;
г - испытуемый раствор, взятый для титрования, мл;
б – навеска взятого на анализ фитоэкстракта, г;
100 % - постоянный добавочный %.

Результаты анализа: в 1 г сухого экстракта Padus Grayanae Maxim сождержание моносахаридов составило 5,8%.

Определение олигосахаридов

После взятия пробы для определения моносахаридов из раствора взяли 50 мл, добавили 5 мл 5% - ного раствора соляной кислоты и провели гидролиз при 85ºС - 90ºС на кипящей водяной бане в течение 45 минут. Далее гидролизат нейтрализовали растворм 10% - ного едкого натрия до pH 6,5-7,0 и отфильтровали, довели объем дистиллированной водой в мерной колбе до 100 мл, затем отбирали 10 мл этого раствора и титровали таким же методом, что и при определении моносахаридов. По разности между титрованием контрольного опыта и испытуемого раствора, пользуясь таблицей [230], находили содержание сахара (глюкоза), исходя из того, что 1 мл 0,1 н раствора тиосульфата натрия соответствует 6,4 мг восстановленной меди. Процентное содержание олигосахарида в сухом экстракте вычисляли по формуле 4.4.:

Формула 4.4.

$$X = \frac{а \cdot в \cdot д \cdot 100\%}{б \cdot г \cdot е}$$

где:

а – количество глюкозы, найденное по таблице, мг;

б – навеска экстракта, взятого на анализ, г;

в – разбавление раствора, взятого для титрования, мл;

г – количество испытуемого раствора, взятого для титрования, мл;

е – количество пробы, взятой для гидролиза, мл;

100% - постоянный добавочный %.

Результаты анализа: содержание олигосахаридов 1 г сухого экстракта Padus Grayanae Maxim составило 8,2%.

Определение полисахаридов

К навеске (1 г) сухого экстракта из надземных частей Padus Grayanae Maxim прибавили 100 мл воды дистилированной и нагревали в течение 2 ч

при 80ºС – 85ºС. Затем остывший раствор переносили в мерную колбу емкостью 100 мл и довели до метки дистиллированной водой. Из этого объема взяли 50 мл для гидролиза полисахарида, перешедшего в раствор, для чего к 50 мл прибавили 5 мл 5% -ного раствора соляной кислоты и нагревали в течение 45 минут.

После гидролиза раствор нейтрализовали 10%-ным раствором едкого натрия до pH = 6,5- 7,0 переносили в колбу емкостью 100 мл и довели объем до метки дистиллированной водой. В дальнейшем определяли сахар по Бертрану, как определяли олигосахариды.

В совершенно аналогичных условиях, но без испытуемого фитоэкстракта, проводили контрольный опыт. По разности, полученной между титрованием контрольного и испытуемого растворов, пользуясь данными таблицы [230], находили содержание сахара (глюкозы), исходя из того, что 1 мл 0,1 н. раствора гипосульфита натрия соответствует 6,4 мг восстановленной меди. Содержание полисахаридов в сухом экстракте вычисляли по формуле 4.5:

Формула 4.5.

$$X = \frac{а \cdot б \cdot 100 \cdot 100\%}{в \cdot 50 \cdot г}$$

где:

а – количество глюкозы, найденной по таблице, мг;

б – разбавление раствора, мл;

в – навеска фитоэкстракта, мг;

г – количество испытуемого раствора, взятого на титрование, мл;

50 – объем взятый для гидролиза, мл;

100 – объем извлечения, взятый после гидролиза, мл.

Результаты анализа: в 1 г сухого экстракта Padus Grayanae Maxim содержание полисахаридов составило 13%.

Установленные количественные параметры содержания моно-, олиго- и полисахаридов могут быть использованы при разработке аналитической

нормативной документации для лекарственных форм фитопрепарата из сухого экстракта Padus Grayanae Maxim [248].

4.2.4. Определение содержания химических элементов в фитоэкстракте Padus Grayana maxim

Результаты исследований содержания химических элементов сухом экстракте Padus Grayana Maxim представлены в таблице 4.2.4.1, с учетом классического деления минеральных элементов по количественному признаку на макроэлементы, микроэлементы и ультрамикроэлементы.

Таблица 4.2.4.1. Содержание химических элементов в сухом экстракте Padus Grayana Maxim

Наименование химического элемента	Количество, мкг/100мг	Рекомендуемая суточная потребность для человека
Макроэлементы		
Ca	880,02	800 -1000 мг
Mg	1203,04	400 мг
Na	23,98	2000 мг
K	3465,38	2500мг
P	233,68	800 мг
Микроэлементы		
Fe	2,92	10 - 15 мг
Zn	3,66	12 мг
Cu	0,18	1 мг
Mn	4,75	2 мг
Al	1,58	30 – 50 мг
Ni	0,51	100 – 300 мкг
B	3,57	1-3 мг
Ba	0,22	0,5 – 1 мг
Cr	1,02	50 мкг
Se	0,26	50-70 мкг
Mo	0,041	45 мкг
Co	<0,032	10 мкг
Li	<0,008	100 мкг

Bi	<0,008	Не известна
Sb	<0,16	0,01 – 0,02 мг
Sn	<0,16	2 мг
Pb	<0,16	0,35 – 0,5 мг
Sr	2,05	1 мг
Ультрамикроэлементы		
Ag	<0,024	30 мкг
Be	<0,0016	10 – 20 мкг
Мышьяк		
As	<0,32	0,01 – 0,03мг

Установлено, что в сухом экстракте Padus Grayana Maxim присутствует 26 химических элементов. Основные макроэлементы распределились в порядке их убывания следующим образом: **K > Mg > Ca > P > Na.**

Поскольку фитоэкстракт Padus Grayana Maxim обладает иммуномодулирующим действием [249, 250], особый интерес представляет определение в нем содержания микроэлементов – биофилов.

Как известно, микроэлементы выполняют важные функции регуляции активности метаболических систем и геномного аппарата клетки. Такие из них, как железо, марганец, селен, цинк, никель, оказывают действие на уровне мессенджерных внутриклеточных систем, индуцируя продукцию и потенцируя действие целого ряда клеточных цитокинов, стимулирующих естественные киллеры. Иммуноцитокины обеспечивают эффективность киллерного цитолизиса и способствуют снижению резистентности к нему опухолевых клеток [251].

Биогенные микроэлементы, также входят в состав ферментов и нередко бывают лимитирующими факторами для нормального течения обменных процессов в организме.

В ряду микроэлементов в изучаемом экстракте выявлено наибольшее содержание **Mn, B, Zn** и **Fe,** далее следуют **Al, Cr, Ni** и **Se.**

К тяжелым металлам относятся химические элементы (металлы) с атомной массой более 40, или химические элементы с удельным весом выше 5г/см^3 [225].

Специалистами по охране окружающей среды из тяжелых металлов-токсикантов выделена приоритетная группа. В нее входят кадмий, медь, мышьяк, ртуть, свинец, висмут, ванадий, как наиболее опасные для здоровья человека и животных. Из них ртуть, свинец и кадмий являются наиболее токсичными. Мышьяк, сурьма и висмут, как представители токсических элементов пятой группы периодической системы, наиболее часто встречаются в окружающей среде.

Гигиеническая оценка содержания тяжелых металлов в сухом экстракте Padus Grayanae Maxim выявила отсутствие превышения ПДК тяжелых металлов, принятых для лекарственных средств и биологически активных добавок на растительной основе [252, 253].

Таким образом, концентрация химических элементов в сухом экстракте Padus Grayana maxim не превышает допустимых уровней.

В фитоэкстракте Padus Grayanae Maxim выявлено наибольшее содержание биогенных микроэлементов **Mn, B, Zn** и **Fe.** Содержание тяжелых металлов в сухом экстракте Padus Grayanae Maxim не превышает их допустимых уровней, принятых для лекарственных средств и биологически активных добавок на растительной основе [254].

4.3. Микробиологическая чистота, как показатель качества сухого экстракта из надземных частей Padus Graynae Maxim

Испытание на микробиологическую чистоту включало подготовку различных образцов перед испытанием, отбор проб образцов для анализа, методы количественного определения жизнеспособных бактерий и грибов, выявление и идентификацию отдельных видов бактерий, наличие которых недопустимо или ограничено в нестерильных лекарственных средствах.

Испытание проводилось в асептических условиях, с целью предотвращения контаминацию исследуемых образцов.

Количественное определение микроорганизмов. Испытание проводилось двухслойным методом в чашках Петри. Образец в количестве 10 г растворяли в фосфатном буферном растворе pH 7.0 так, чтобы конечный объем раствора составлял 100 мл.

Определение количества аэробных бактерий. Из приготовленного раствора вносили по 1 мл в каждую из двух пробирок с 4 мл среды № 1 охлажденной до температуры 45^0С. Быстро перемешивали содержимое пробирки и переносили в чашку Петри, содержащую 20 мл застывшей питательной среды № 1. Вращательными движениями чашки равномерно распределяли верхний слой среды. После застывания среды чашки переворачивали и инкубировали в течение 5 суток при температуре 35^0С. Через 48 ч и окончательно через 5 суток подсчитывали число колоний на двух чашках, находя среднее значение, умножали его на показатель разведения, и вычисляли число бактерий в 1 г образца.

Определение общего числа грибов. Испытание проводили двуслойным агаровым методом, описанным выше, используя среду № 2. Посевы инкубировали в течение 5 суток при температуре 22^0С. Через 72 часа и окончательно через 5 суток подсчитывали общее число колоний дрожжевых и плесневых грибов на двух чашках, находили среднее значение, умножали его на показатель разведения, т.е. на 10, и вычисляли число грибов в 1г образца.

Выделение и идентификация семейства Enterobacteriaceae. Образец в количестве 10 г вносили в 100 мл среды № 11, перемешивали и инкубировали в течение 2 ч. После инкубации содержимое флакона (гомогенат А) перемешивали и переносили 10 мл в 100 мл среды № 3. Посев инкубировали в течение 18-48 ч. При появлении роста делали пересев на плотную среду № 4, инкубировали в течение 18-24 ч. Появление на среде

колоний грамотрицательных палочек являлось свидетельством того, что исследуемый образец был контаминирован бактериями.

Количественное определение: Использовали 3 пробирки с 9 мл среды № 3. Гомогенат А в количестве 1 мл (соответствовал 0,1 г образца) вносили в первую пробирку, тщательно перемешивали и переносили 1 мл (соответствует 0,01 г образца) во вторую пробирку, снова перемешивали и переносили 1 мл (соответствует 0,001 г образца) в третью пробирку, меняя пипетку после каждого шага. Посевы инкубировали в течение 24-48 ч. В случае роста, для подтверждения наличия энтеробактерий делали пересев петлей на плотную среду № 4 и инкубировали чашки Петри в течение 18-24 часов. Появление на плотной среде колоний грамотрицательных палочек говорило о положительном тесте, отсутствие роста колоний об отрицательном тесте. Наиболее вероятное количество энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов в 1 г образца определяли по таблице 4.2.1.

Таблица 4.2.1 - Определение количества энтеробактерий и других грамотрицательных бактерий в образце

Соответствующее количество испытуемого образца			**Наиболее вероятное количество бактерий в 1 г образца**
0,1 г	**0,01 г**	**0,001 г**	
1 мл гомогената 1	**1 мл гомогената 1 в разведении 1:10**	**1 мл гомогената 1 в разведении 1:100**	
+	+	+	Более 10^3
+	+	-	От 10^2до10^3
+	-	-	От 10^1 до 10^2
-	-	-	Менее 10^1

Обозначения: (+) - положительный тест; (-) - отрицательный тест

Выявление Escherichia coli. Исследуемый образец, разведенный стерильным буферным раствором 1:10, переносили в количестве 10 мл (соответствует 1 г) в 100 мл жидкой питательной среды № 8, перемешивали и

инкубировали в течение 18-48 часов. Затем 1 мл содержимого флакона переносили в 10 мл среды № 3.

Посевы инкубировали в течение 18-24 часов. При наличии роста, в случае равномерного помутнения среды в пробирках, делали пересев на среду № 4. Посевы инкубировали в течение 18-24 ч. На среде № 4 E.coli образовывали - малиновые колонии с металлическим блеском, окруженные малиновыми зонами, неслизистые. Подозрительные на принадлежность к E. coli колонии на плотных средах микроскопировали. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек отдельные колонии отсевали на скошенную в пробирках среду № 1 и инкубировали в течение 18-24 ч.

Для подтверждения результатов использовали биохимические тесты. Из пробирок с чистой культурой делали пересевы на агар Симмонса и соево-казеиновый бульон (среда № 15), а также проводили тест на наличие фермента цитохромоксидазы. Через 18-24 часов инкубации отмечали бактериальный рост или его отсутствие на агаре Симмонса (среда № 14). Утилизацию цитрата определяли по смещению pH-среды в щелочную сторону (изменению цвета среды из зеленого в синий). Наличие индола определяли по появлению красного кольца на поверхности соево-казеинового бульона при добавлении реактива Ковача.

Если в образце обнаруживали грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом цитохромоксидаза, не утилизирующие цитрат натрия и образующие индол, считали, что лекарственное средство контаминировано E.coli.

Количественное определение E. coli. Количественное определение E.coli проводили таким же образом, как количественное определение других энтеробактерий, делая пересев из гомогената А в пробирки со средой № 3. В случае равномерного помутнения среды в пробирках для подтверждения наличия E. coli из каждой пробирки делали пересев петлей на плотную среду № 4. Посевы инкубировали в течение 18-24 часов. Появление на средах характерных для E. coli колоний грамотрицательных палочек являлось

положительным тестом, отсутствие роста этих колоний - отрицательным тестом.

Выявление бактерий рода Salmonella. В начале 10,0 г исследуемого образца переносили в 100 мл среды № 8, перемешивали и инкубировали в течение 18-24 ч. При наличии роста 1 мл после перемешивания переносили в 10 мл среды № 12 и инкубиравали в течение 16-24 часов. Затем делали пересев петлей на Висмут-сульфит агар и инкубировали в течение 24-48 ч. На Висмут-сульфит агаре бактерии из рода Salmonella образовывали черные колонии с характерным металлическим блеском, при этом участок среды под колонией прокрашивался в черный цвет.

Колонии, подозрительные на принадлежность к роду Salmonella, микроскопировали. При обнаружении в мазках грамотрицательных палочек, 2-3 характерные колонии (каждую отдельно) пересевали на трехсахарный агар с солями железа (среда № 13), нанося большое количество культуры петлей сначала на скошенную часть агара, а потом уколом в столбик, не касаясь дна пробирки.

Через 24 часа инкубации, в столбике питательной среды отмечали изменение цвета из красного в желтый. Почернение среды свидетельствовало об образовании сероводорода - типичном признаке видов рода Salmonella. Параллельно ставили тест на наличие фермента «цитохромоксидаза», используя чистую культуру со скошенного агара среды № 1. Если требовалось дополнительное подтверждение, использовали подходящие биохимические и серологические тесты.

Если в образце обнаруживали грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие ферментом «цитохромоксидазой», не ферментирующие сахарозу и лактозу и выделяющие сероводород, считали, что лекарственное средство было контаминировано бактериями рода Salmonella.

Выявление Staphylococcus aureus. Исследуемый образец, разведенный стерильным буферным раствором 1:10, переносили в

количестве 10 мл (соответствует 1 г) в 100 мл жидкой питательной среды № 8, перемешивали и инкубируюовали в течение 24-48 часов. При наличии роста пересевали петлей на среду № 10 и инкубировали в течение 24-48 часов. Золотисто-желтые колонии, окруженные желтыми зонами, на среде № 10 свидетельствовали о наличии S.aureus

Для идентификации использовали реакцию плазмокоагуляции с чистой культурой стафилококка, отсеянной на среду № 1.

Если в образце обнаруживали грамположительные кокки, ферментирующие маннит (среда № 10), обладающие ферментом коагулаза, считали, что лекарственное средство контаминировано S.aureus.

Результаты изучения микробиологической чистоты сухого экстракта Padus Graynae Maxim представлены в таблице 4.2.2.

Таблица 4.2.2 – Результаты исследования микробиологической чистоты сухого экстракта Padus Graynae Maxim

Требования НД	**Результаты испытаний**
Общее число аэробных бактерий не более 10^4 КОЕ/г (колонии образующие единицы в 1 грамме)	Менее $1x10^1$ КОЕ/г
Общее число грибов не более 10^2КОЕ/г	Менее $1x10^1$ КОЕ/г
Отсутствие Escherichia coli в 1 г.	Не обнаружено
Энтеробактерий, устойчивых к желчи, не более 10^2 КОЕ в 1 г	Не обнаружено
Отсутствие Salmonella в 10 г	Не обнаружено
Отсутствие Pseudomonas aeruginosa в 1 г	Не обнаружено
Staphylococcus aureus в 1 г	Не обнаружено

Таким образом, показатели микробиологической чистоты сухого экстракта Padus Graynae Maxim соответствуют требованиями ОФС 42-0067-07 Государственной Фармакопеи РФ XII изд. и могут быть использованы для обеспечения качества субстанции – сухого экстракта Padus Graynae Maxim для изготовления нестерильных форм лекарственных средств для приема внутрь [255].

4.4. Стандартизация полученного сухого экстракта (субстанции) по регламентируемым показателям

Стандартизация полученного сухого экстракта (субстанции) проводилась согласно требованиям монографии Европейской Фармакопеи 6-го издания [227] по следующим регламентируемым показателям:

- органолептические показатели (внешний вид, цвет);
- количественное определение содержания хлорогеновой и кофейной кислот;
- потеря массы при высушивании;
- содержание тяжелых металлов.

Для стандартизации исследованы три партии сухих экстрактов, полученных из надземных частей Padus Graynae Maxim, собранные с разницей по времени в пятнадцать дней: 15 июля, 30 июля и 1 августа. Такой разброс во времени сбора сырья обусловлен необходимость учета колебаний регламентируемых показателей в зависимости от времени сбора растительного сырья.

Внешний вид

Внешний вид всех полученных партий стабилизированного сухого экстракта практически не отличается, и представляет собой сыпучий порошок светло-бежевого цвета со слабым специфическим запахом.

Потеря массы при высушивании

Потеря массы при высушивании определялась согласно монографии Европейской фармакопеи 6-го издания «потеря массы экстрактов при высушивании» [227]: в выпарительную чашку отвешено 0,5 г образца сухого экстракта и чашка с содержимым помещена в сушильный шкаф при температуре 100-105°C на 3 часа, затем образец в чашке охлажден над

безводным силикагелем в эксикаторе и вновь взвешен на аналитических весах.

Потеря в массе при высушивании образцов сухого экстракта, полученные из надземных частей Padus Graynae Maxim, собранных 15 июля, 30 июля и 1 августа, составила от 2,5% до 6%, что соответствует требованиям Европейской фармакопеи 6-го издания [227].

Содержание тяжелых металлов

Содержание тяжелых металлов в образцах сухого экстракта определено согласно фармакопейному методу «Определение тяжелых металлов в зольном остатке органических препаратов», описанному в ГФ XI [226].

В фарфоровый тигель поместили 1,0 г образца сухого экстракта Padus Graynae Maxim. Добавили 4 мл кислоты серной разведенной. Перемешали при помощи тонкой стеклянной палочки и, осторожно нагревая, выпарили досуха. Затем тигель прокалили в муфельной печи, следя за тем, чтобы температура не превышала 800ºС, до образования белого или сероватого остатка. Зольный остаток обрабатывали при нагревании на сетке с 2 мл насыщенного раствора ацетата аммония, нейтрализованного раствором едкого натра, прибавляли 3 мл воды очищенной и фильтровали в пробирку через беззольный фильтр небольшого диаметра, предварительно промытый 1% раствором уксусной кислоты, а затем - горячей водой очищенной. Тигель и фильтр промывали 5 мл воды очищенной, пропуская ее через тот же фильтр в ту же пробирку.

Для приготовления эталона в тигель поместили серную кислоту в количестве, взятом для сжигания исследуемого сухого экстракта, и далее поступили, как с сухим экстрактом, но промывание тигля и фильтра производили лишь 3 мл воды очищенной, после чего к фильтрату прибавляли 2 мл эталонного раствора сравнения.

Эталонный раствор свинца – иона: 0,915 г свежеперекристаллизованного ацетата свинца растворяли в воде в мерной

колбе вместимостью 1 л, прибавляли 1 мл разведенной уксусной кислоты и доводили объем раствора водой очищенной до метки.

Эталонный раствор сравнения: 1 мл эталонного раствора поместили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора водой очищенной до метки. Этот раствор содержит 0,005 мг (5 мкг) свинец – иона в 1 мл. Эталонный раствор сравнения использовали свежеприготовленным (пригоден только в день его приготовления).

По результатам испытаний всех образцов сухого экстракта, полученных из надземных частей Padus Graynae Maxim, собранных 15 июля, 30 июля и 1 августа, содержание тяжелых металлов в образцах не превышало 0,01%.

Содержание хлорогеновой и кофейной кислот

Анализ содержания хлорогеновой и кофейной кислот в сухом стабилизированном экстракте Padus Grayanae Maxim проведено методом ВЭЖХ.

Подготовка образца

1 г сухого экстракта помещают в плоскодонную колбу, добавляют 50 $см^3$ 50 %-ного этанола, смесь нагревают на водяной бане при 55-60°С в течение 30 минут. Экстракцию повторяют пятикратно. Полученные спиртовые экстракты охлаждают, фильтруют и доводят их объем до 250 $см^3$ 50 %-ным этанолом.

Приготовление раствора стандартного образца

Навески стандартного образца хлорогеновой и кофейной кислот растворяют в 50 % растворе этанола с помощью ультразвуковой бани в течение 5 минут. Концентрация раствора кофейной и хлорогеновой кислот в растворе - 0,1 мг/мл.

Приготовление подвижной фазы.

7,1 мл ледяной уксусной кислоты наливаем в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводим до метки водой для ВЭЖХ и перемешиваем.

Условия хроматографического разделения: колонка Zorbax ODS, 5 мкм, 250 х 4,6 мм; предколонка – ODS, 5 мкм, 20 х 4,6 мм; объем инъекции 20 мкл; подвижная фаза: смешивается метанол и 1,5% уксусная кислота в соотношении от 20:80 до 40:60 в течение 60 минут. Скорость потока: 1см^3/мин; температура колонки - 45°С; длина волны: 275 нм.

Содержание действующих веществ вычисляют по формуле 4.6:

Формула 4.6.

$$X = \frac{S_1 * \ m_0 * V_1 * P * 100}{S_0 * V_0 * \ m_1 * 100 * (100 - W)}$$

где:

S_1 = площадь основного пика на хроматограмме испытуемого образца;

S_0 = площадь основного пика на хроматограмме стандартного образца;

m_1 - масса навески препарата, в миллиграммах;

m_0 - масса навески стандартного образца, в миллиграммах;

V_1 – объем разведения испытуемого образца, в миллилитрах;

V_0 – объем разведения стандартного образца, в миллилитрах;

P - чистота стандартного образца, в процентах;

W – содержание влаги в испытуемом образце, в процентах

В результате проведенных исследований было установлено, что в образцах стабилизированного сухого экстракте Padus Grayanae Maxim, полученных из растительного сырья, заготовленного в разные периоды, содержится:

- хлорогеновая кислота - от 0,24% до 0,37%;
- кофейная кислота - от 0,025% до 0,035%.

Стабильность сухого экстракта

Образцы стабилизированного сухого экстракта из надземных частей Padus Graynae Maxim были поставлены на хранение в течение 1 года в термостат при температуре 25°С для изучения стабильности. Образцы проверялись каждые 3 месяца по следующим показателям: внешнему виду, потере массы при высушивании, содержанию хлорогеновой кислоты и кофейной кислоты.

За весь период хранения указанные показатели оставались на уровне данных, полученных при первичном исследовании.

На основании проведенных исследований по стандартизации были получены регламентируемые показатели для стабилизированного сухого экстракта надземных частей Padus Graynae Maxim, представленные в таблице

Таблица 4.4.1 – Регламентируемые показатели качества сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Наименование показателя	Значение показателя
Органолептические показатели	
Описание	Сыпучий порошок светло-бежевого цвета со слабым специфическим запахом. При долгом хранении допускается незначительное комкование, образовавшиеся комочки рассыпаются при слабом нажатии.
Физико-химические показатели	
Потеря массы при высушивании (%)	Не более 6%
Содержание тяжелых металлов (%)	не более 0,01%.
Содержание хлорогеновой кислоты(%)	не менее 0,24%
Содержание кофейной кислоты (%)	не менее 0,025%.

Условия хранения: в сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25°С.

Срок хранения: 1 год.

Примечание: Срок хранения 1 год установлен на основании изучения образца стабилизированного сухого экстракта в течение одного года и может быть пересмотрен в сторону увеличения на основании дальнейшего изучения стабильности при более долгосрочном хранении.

Заключение по 4 главе

В результате проведенных исследований впервые теоретически обоснован и экспериментально подтвержден способ получения сухого экстракта Padus Grayanae Maxim, включающий в себя основные стадии: экстрагирование, упаривание, очистку, сушку и стабилизацию.

Изучено содержание биологически активных веществ в сухом экстракте Padus Grayanae Maxim: рутина, кверцитина, аскорбиновой, кофейной и хлорогеновой кислот, сахаров, микро- и макроэлементов.

Разработаны показатели качества полученного фитоэкстракта, необходимые для его стандартизации согласно фармакопейным требованиям.

ГЛАВА 5
ФАРМАКО - ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУХОГО ЭКСТРАКТА PADUS GRAYANAE MAXIM

При разработке новых лекарственных препаратов одним из ключевых звеньев является изучение их токсических свойств. Комплекс исследований в этом направлении включает изучение острой и хронической токсичности, а также специальные токсикологические исследования, включающие изучение аллергизирующей активности, проявления мутагенности и канцерогенности и др.

Существует устойчивое мнение, что в отличие от новых химических соединений, большая часть лекарственных препаратов, полученных из лекарственного растительного сырья, не содержащего сильнодействующих веществ, не имеют часто встречающихся побочных эффектов и их применение безопасно даже в процессе длительного использования [256, 257, 258, 259].

Следует отметить, что широко распространенное убеждение об абсолютной безопасности фитотерапии ошибочно. Известно, что ряд растений обладает токсическими свойствами, т.к. в их состав входят сильнодействующие вещества (например, аконит, ландыш майский; красавка и др.), а у людей с атопией применение любых фитопрепаратов может привести к развитию тяжелых аллергических реакций.

Поэтому при изучении новых лекарственных субстанций растительного происхождения проведение токсикологических исследований является обязательным для всех лекарственных средств растительного происхождения, независимо от источника и способа их получения. К ним относятся и сухие очищенные растительные экстракты в виде субстанций, выделенные из лекарственного растительного сырья [233].

Следовательно, для обеспечения безопасной фармакотерапии с использованием лекарственных препаратов растительного происхождения,

на доклиническом этапе их изучения необходимо исследовать их токсикологические характеристики – острую, хроническую и специфическую токсичность.

Объем доклинических испытаний токсикологических характеристик определялся в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. Миронова А.Н., 2012 [233, 260].

5.1. Изучение острой токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim.

Исследование острой токсичности проводилось на половозрелых аутбредных самцах и самках белых мышей массой 20 г ± 10% и крысах массой 155 г ± 10%. Каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный номер.

Раствор исследуемого вещества готовили путем растворения необходимой навески в воде очищенной. В случае образования суспензии, раствор перед введением тщательно взбалтывали. Исходя из предельно допустимых объемов вводимой жидкости на одно животное, объем вводимого вещества составлял не более 0,8 мл на 1 мышь, и не более 4 мл на 1 крысу.

Опыты проводились на 84 интактных аутбредных белых мышах и 84 крысах, полученных из одного питомника и прошедших двухнедельный карантин в виварии по месту выполнения исследований.

В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние), дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность).

Животные находились в условиях вивария на стандартной диете, пищу получали в одно и то же время суток. Экспериментальных животных распределяли по группам, по 7 особей одного пола в клетке. 4 группы

животных получали изучаемое вещество, 1 группа являлась виварийным контролем, 1 группа получала воду очищенную.

Маркировка животных проводилась отметкой маркером участка шерсти на конечностях, спине и голове. Животные имели свободный доступ к корму и водопроводной питьевой воде. Для питья использовали поилки (стеклянные бутыли по 500 мл с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре). Перед началом эксперимента животных не кормили в течение 3 часов. Раствор исследуемого вещества вводили утром, интрагастрально, с помощью зондов.

Растительное происхождение исследуемого сухого экстракта предполагает его низкую токсичность. Исходя из этого, изучаемое вещество вводили в дозах 500 мг/кг; 1000 мг/кг, 1500 мг/кг и 2000 мг/кг - в самой высокой дозе, технически достижимой для этого вида экспериментальных животных. 14 животных составили группу виварийного контроля, 14 животных получали воду очищенную в эквивалентном объеме.

В первые 6 часов после введения изучаемого вещества животные находились под непрерывным наблюдением. Результаты были зафиксированы письменно и систематизированы.

Оценка результатов эксперимента проводилась через одни сутки после введения сухого экстракта Padus Grayanae Maxim - учитывалось количество погибших животных. В дальнейшем наблюдение за подопытными животными производилось еще в течение 2 недель от момента введения исследуемого вещества.

При оценке токсичности ежедневно учитывались следующие интегральные показатели: общее состояние животных; интенсивность и характер двигательной активности; состояние кожного покрова и слизистых оболочек; тонус скелетных мышц, наличие и характер судорог; реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители; частота и глубина дыхательных движений; количество и консистенция фекальных масс; частота мочеиспускания и окраска мочи; потребление корма и воды.

Результаты изучения переносимости изучаемого фитоэкстракта отражены в таблицах 5.1.1 и 5.1.2.

Таблица 5.1.1. - Летальные эффекты (пало/всего) сухого экстракта Padus Grayanae Maxim при внутрижелудочном введении половозрелым мышам

Группы животных	Стандартный рацион питания	Вода очищенная	Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim, мг/кг			
		0,8 мл/особь	500	1000	1500	2000
Изучаемый сухой экстракт, самцы		-	0/7	0/7	0/7	0/7
Изучаемый сухой экстракт, самки		-	0/7	0/7	0/7	0/7
Контрольная группа, самцы		0/7	-	-	-	-
Контрольная группа, самцы		0/7	-	-	-	-
Виварийный контроль, самцы	0/7					
Виварийный контроль, самцы	0/7					

Таблица 5.1.2. Летальные эффекты (пало/всего) сухого экстракта Padus Grayanae Maxim при внутрижелудочном введении половозрелым крысам

Группы животных	Стандартный рацион питания	Вода очищенная	Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim, мг/кг			
		4мл/особь	500	1000	1500	2000
Изучаемый сухой экстракт, самцы		-	0/7	0/7	0/7	0/7
Изучаемый сухой экстракт, самки		-	0/7	0/7	0/7	0/7
Контрольная группа, самцы		0/7	-	-	-	-
Контрольная группа, самцы		0/7	-	-	-	-
Виварийный контроль, самцы	0/7					
Виварийный контроль, самцы	0/7					

Таким образом, через 24 часа после введения сухого экстракта Padus Grayanae Maxim во всех изучаемых дозах была выявлена 100%

выживаемость экспериментальных животных как контрольных, так и опытных групп [261].

После введения исследуемого вещества мыши и крысы сохраняли активность. Поведенческие реакции были стереотипическими для данного вида животных и не отклонялись от нормы. Реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители – без изменений. Состояние шерстного и кожного покрова, окраска слизистых – без патологических изменений.

Дальнейшее наблюдение за животными в течение последующих 14 дней после введения изучаемого вещества показало, что и в этот период ни в одном случае гибели животных отмечено не было. Общее состояние животных экспериментальных групп ничем не отличалось от состояния животных контрольных групп, различий половой чувствительности к изучаемому веществу так же не выявлено, т.е. воздействие, как на самцов, так и на самок было идентичным.

Сравнительный анализ динамики массы тела животных экспериментальных и контрольных групп не выявил статистически значимых различий (табл. 5.1.3, 5.1.4).

Таблица 5.1.3 – Динамика массы тела мышей в исследовании острой токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в дозе 2000 мг/кг (M±m, p>0,05)

Пол	0 день	3 день	6 день	9 день	14 день
	Контрольная группа				
Самцы N=7	19,8±0,9	19,9±1,0	20,2±1,1	20,6±1,0	20,8±0,7
Самки N=7	20,2±0,8	20,2±0,7	20,5±0,7	20,7±0,8	20,9±0,8
	Экспериментальная группа (2000 мг/кг)				
Самцы N=7	20,3±0,7	20,5±1,0	20,8±1,0	20,8±0,8	21,1±0,8
Самки N=7	20,3±0,8	20,0±0,6	20,7±0,7	21,0±0,8	21,2±0,6

Таблица 5.1.4 – Динамика массы тела крыс в исследовании острой токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в дозе 2000 мг/кг (M±m, p>0,05)

Пол	0 день	3 день	6 день	9 день	14 день
	Контрольная группа				
Самцы N=7	123,2±1,2	124,7±1,0	126,7±1,1	127,4±1,2	129,7±1,7
Самки N=7	122,9±1,8	122,2±2,1	125,8±1,7	127,1±1,8	128,8±1,8
	Экспериментальная группа (2000 мг/кг)				
Самцы N=7	126,3±2,7	126,5±2,0	127,2±1,9	128,8±1,8	129,1±2,1
Самки N=7	125,3±1,8	125,0±1,6	126,7±1,7	128,0±1,8	129,2±1,6

На 14 день от начала эксперимента животных умерщвляли цервикальной дислокацией и вскрывали с оценкой внешней поверхности тела, всех проходов, черепной, грудной, брюшной полостей и их содержимого. Органы, извлеченные при некропсии, были взвешены, парные органы взвешивались вместе.

Результаты некропсии внутренних органов мышей и крыс у животных экспериментальных и контрольных групп отличий не имели (рис. 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3, 5.1.4).

Рис. 5.1.1. Обзорная фотография некропсии мыши из группы животных, получавших сухой экстракта Padus Grayanae Maxim в дозе 2000 мг/кг

Грудная полость была свободной от жидкости, поверхность плевры без изменений; легкие бледно-розового цвета, воздушные, отдельные доли полнокровны. В сердце четко прослеживались коронарные сосуды. Купол диафрагмы не изменен.

Поверхность висцеральных органов, петли кишечника (тонкого и толстого), брыжеечные лимфатические узлы были без изменений. Селезенка темно – вишневого цвета была увеличена, при продольном срезе не оставляла соскоб на лезвие скальпеля. Почки светло – коричневого цвета, капсула почки легко снималась. При разрезе граница между мозговым и корковым слоем четко дифференцировалась, лоханки расширены и несколько отечные. В желудке отмечалось содержимое, складчатая структура слизистой была сохранена. При поперечном разрезе двенадцатиперстной кишки вытекал гомогенный химус желтого цвета без запаха. Петли толстого кишечника вздуты. Органы репродуктивной системы были без изменений. При зондировании рога матки проходимы. Полость рта свободная, слизистая без изменений.

Гистологическое исследование печени тонкого кишечника, селезёнки (рис. 5.1.2 – 5.1.4), желудка, сердца и почек экспериментальных животных – мышей и крыс, не выявило патологических изменений во внутренних органах.

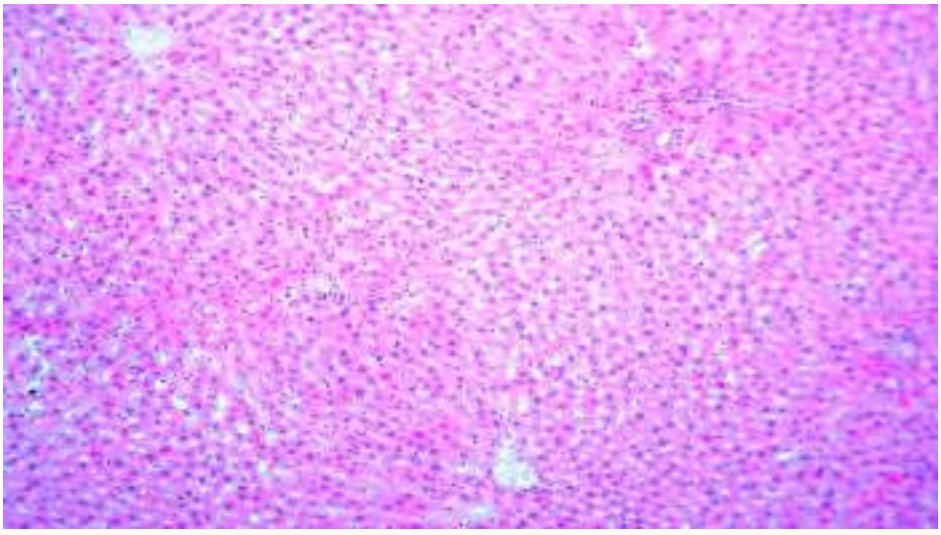


Рис. 5.1.2. – Печень мыши из группы животных, получавших сухой экстракта Padus Grayanae Maxim в дозе 2000 мг/кг

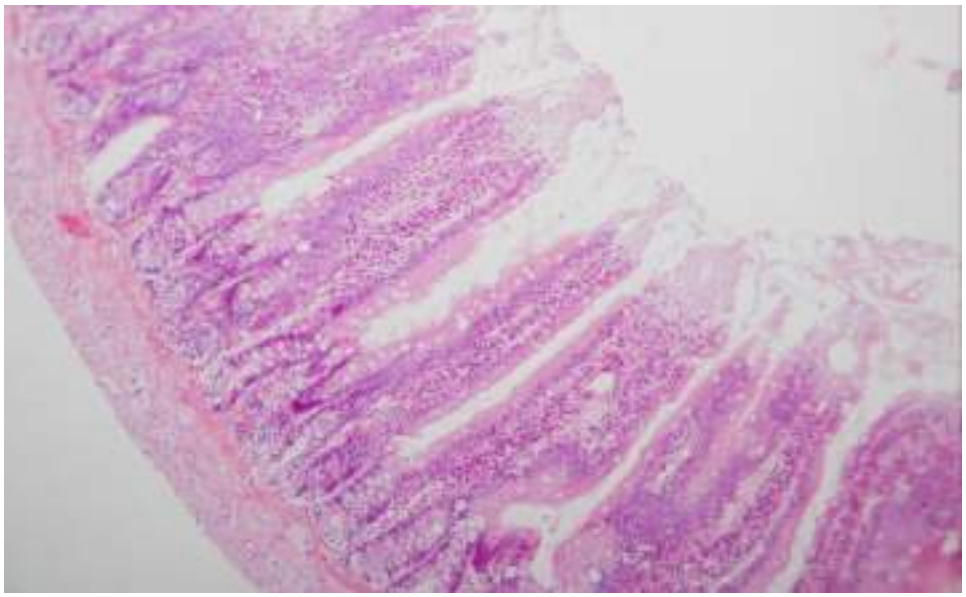


Рис. 5.1.3. – Тонкий кишечник мыши из группы животных, получавших сухой экстракта Padus Grayanae Maxim в дозе 2000 мг/кг

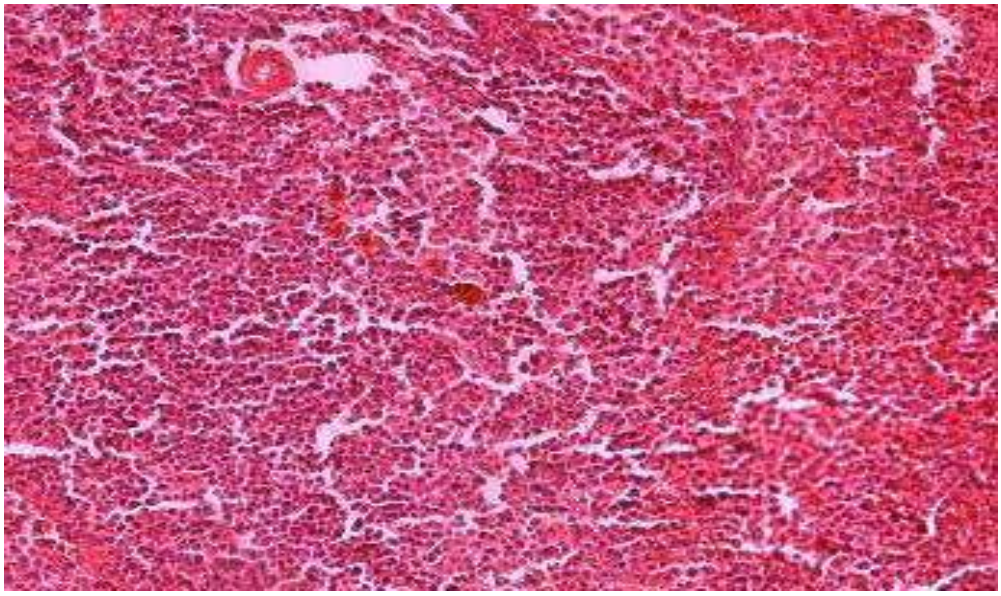


Рис. 5.1.4. – Селезёнка мыши из группы животных, получавших сухой экстракта Padus Grayanae maxim в дозе 2000 мг/кг

Таким образом, изучение острой токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на мышах и крысах при внутрижелудочном пути введения не позволило установить средней смертельной дозы ($ЛД_{50}$) поскольку в максимально выбранной дозе 2000 мг/кг не приводило к летальности и не обладало токсичностью.

Животные хорошо переносили исследуемое вещество. Некропсия и гистологическое исследование внутренних органов патологических изменений не выявили.

Полученные результаты не противоречат имеющимся литературным данным, согласно которым ароматические карбоновые кислоты – хлорогеновая и кофейная кислоты, практически нетоксичны. Только при парентеральном – внутрибрюшинном введении крысам для них удалось установить $ЛД_{50}$ – более 2,4 и 1,25 г/кг, соответственно [262]. При этом их сочетание, а также присутствие других полифенольных соединений существенного влияния на токсичность не имеет [263].

По результатам изучения острой токсичности согласно международной системе классификации токсичности веществ GHS [260] сухой экстракт Padus Grayanae Maxim можно отнести 5 классу токсичности.

5.2. Изучение хронической токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Целью данного раздела исследований являлось изучение переносимости и безопасности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim при длительном введении. Эксперименты были выполнены на 112 половозрелых аутбредных крысах массой 155г ± 10% в трех изучаемых дозах при введении в течение 1 и 3 месяцев.

Способ введения и выбор доз

В течение эксперимента изучаемое вещество хранилось при комнатной температуре, в темноте, в плотном закрытом контейнере. Изучаемое вещество вводили животным внутрижелудочно с помощью зонда 1 раз в сутки за 2 часа до приема пищи один раз в сутки. Продолжительность эксперимента составляла: 30 суток (субхроническая токсичность) и 90 суток (хроническая токсичность).

Расчет доз. Максимальная технически возможная для внутрижелудочного введения доза сухого экстракта Padus Grayanae Maxim для крыс составила 2000 мг/кг. Эта доза и была условно принята за максимально переносимую, в связи с отсутствием гибели животных в экспериментальных группах при изучении острой токсичности.

Для изучения субхронической и хронической токсичности изучаемое вещество вводили в дозах 900 мг/кг, 600 мг/кг и 300 мг/кг. В ходе эксперимента учитывались следующие показатели: масса тела и общее состояние животных, количество гемоглобина, лейкоцитов, СОЭ, а также некоторые биохимические показатели, характеризующие состояние белкового, углеводного и липидного обменов.

Дизайн исследования субхронической и хронической токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim представлен в таблице 5.2.1.

Таблица 5.2.1. – Дизайн исследования

Сроки исследо-вания	**№ гр.**	**Пол**	**Количество животных**			**Исследуемое вещество**	**Доза препарата (мг/кг)**
			Всего	**Некропсия на 31-й день**	**Некропсия на 91-й день**		
1 месяц	1	m	7	7		Вода очищенная	4 мл/особь
		f	7	7			
	2	m	7	7		Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim	300
		f	7	7			
	3	m	7	7			600
		f	7	7			
	4	m	7	7			900
		f	7	7			
3 месяца	5	m	7		7	Вода очищенная	4 мл/особь
		f	7		7		
	6	m	7		7	Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim	300
		f	7		7		
	7	m	7		7		600
		f	7		7		
	8	m	7		7		900
		f	7		7		

Примечание*:* m – самцы; f – самки.

Влияние сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на массу тела

В таблицах 5.2.2 и 5.2.3. представлено влияние исследуемого фитоэктракта на массу тела экспериментальных животных.

Таблица 5.2.2. - Влияние 3-х-месячного внутрижелудочного введения сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на массу тела крыс-самцов, г (M±m)

Экспериментальные группы	Исходные данные	30-й день	60-й день	90-й день
Фитоэкстракт 300мг/кг	127,0±2,9 n=14	156,9±5,5 n=14	187,7±4,1 n=7	219,3±6,3 n=7
Фитоэкстракт 600мг/кг	128,2±3,7 n=14	163,5±5,1 n=14	198,4±4,8 n=7	228,1±6,2 n=7
Фитоэкстракт 900мг/кг	126,7±4,3 n=14	159,2±3,9 n=10	191,4±6,4 n=7	231,8±5,7 n=7
Контроль	129,2±6,7 n=14	165,5±4,3 n=14	188,4±3,2 n=7	218,4±3,7 n=7

Таблица 5.2.3. - Влияние 3-х-месячного внутрижелудочного введения сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на массу тела крыс-самок, г (M±m)

Экспериментальные группы	Исходные данные	30-й день	60-й день	90-й день
Фитоэкстракт 300мг/кг	117,0±2,1 n=14	147,9±3,7 n=14	176,7±3,8 n=7	207,3±2,5 n=7
Фитоэкстракт 600мг/кг	118,5±2,7 n=14	148,5±6,1 n=14	176,4±5,1 n=7	210,1±5,6 n=7
Фитоэкстракт 900мг/кг	117,7±5,3 n=14	151,2±4,7 n=14	183,4±5,4 n=7	211,4±6,8 n=7
Контроль	116,2±5,1 n=14	145,9±6,2 n=14	171,2±5,8 n=7	205,5±6,2 n=7

При анализе в каждом случае данные сравнивались попарно две группы, в соответствии с дозировкой и сроком исследования: контрольная группа – тестируемая группа.

Анализ динамики массы тела крыс, приведенный в таблицах, показывает, что вес животных равномерно увеличивался на протяжении всего исследования, как в контрольной группе, так и в опытных группах. Увеличение дозы препарата в группах экспериментальных животных, получавших фитоэкстракт, не оказывало статистически значимого влияния на динамику массы их тела.

За время проведения эксперимента отмечено, что животные опытных групп выглядят и ведут себя также как и животные контрольной группы. Реакция на взятие в руки и вокализация у всех крыс отсутствовала.

У животных контрольной группы, и у подопытных животных величина зрачка и ширина глазной щели были одинаковые. Отечности или гиперемии слизистых глаз не отмечалось, за исключением незначительных травматических повреждений.

Нос розовый, умеренно влажный, патологические выделения отсутствовали. Уши бледно-розовые, обычной температуры, нагноений, воспаления, загрязнений за весь период наблюдения ни у кого отмечено не было. Зубы сохранены практически у всех, у 1-2 животных в группе имелись сколы на резцах.

Дыхание было нормальным у всех экспериментальных животных. Слезотечения и нарушений слюноотделения не наблюдали. Шерсть у всех животных блестящая, очагов облысения нет. Тонус мускулатуры у всех крыс был нормальным. Видимые слизистые оболочки бледной окраски, блестящие. Половые органы самцов развиты правильно, молочные железы самок без уплотнений на ощупь, выделения из сосков отсутствовали. Деформации или отека конечностей нет.

Влияние сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на гематологические показатели крови

Любое воздействие на живой организм ксенобиотиков, в т.ч. и БАВ, могут в той или иной степени отразиться на количественных и качественных особенностях состава периферической крови. Этим и определяется огромное

значение необходимости изучения гематологических показателей животных при изучении общетоксического действия новых БАВ. Клетки крови, имея высокую реактивность, способны к неспецифическому реагированию в ответ на внешние воздействия.

Таблица 5.2.4. - Влияние сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на гематологические показатели крови у крыс после месячного внутрижелудочного введения (M±m)

Исследуемые показатели	**Контроль (n=10)**	**Фитоэкстракт 300 мг/кг (n=10)**	**Фитоэкстракт 600 мг/кг (n=10)**	**Фитоэкстракт 900 мг/кг (n=10)**
Гемоглобин, г/л	117,4 ± 0,31	117,6 ± 0,31	118,8 ± 0,57	119,0 ± 0,63
	118,5 ± 0,37	124,9 ± 0,50	125,3 ± 0,56	124,8 ± 0,85
Гематокрит, %	42,3± 1,11	41,3± 0,7	43,5± 1,0	44,1± 1,3
	41,7± 1,5	44,1± 1,31	42,4± 1,05	42,8± 0,95
Эритроциты, 10^{12}/л	7,6 ± 0,1	7,59 ± 0,09	7,91 ± 0,11	7,55 ± 0,11
	7,8 ± 0,05	8,7 ± 0,09	8,37 ± 0,11	8,5 ± 0,10
Лейкоциты, 10^{9}/л	7,05 ± 0,08	7,28 ± 0,14	7,45 ± 0,14	7,37 ± 0,14
	7,34 ± 0,10	8,4 ± 0,14*	8,4 ± 0,18**	8,9 ± 0,19***
Лимфоциты, %	62,20 ± 1,05	66,50 ± 1,2	64,30 ± 1,08	63,70 ± 1,4
	63,8 ± 1,25	66,50 ± 1,7	67,8 ± 1,5	67,70 ± 1,6
СОЭ, мм/час	1,6 ± 0,1	1,9 ± 0,3	1,7 ± 0,7	1,75 ± 0,4
	1,75 ± 0,17	1,8 ± 0,15	1,9 ± 0,12	1,62 ± 0,2
Цветной показатель	0,904 ±0,003	0,905 ±0,004	0,911 ±0,005	0,912 ±0,005
	0,914 ±0,004	0,919 ±0,005	0,92 ±0,005	0,917 ±0,005

Примечание:
* – достоверность различий между контрольной и 2 группой <0,05;
** – достоверность различий между контрольной и 3 группой <0,05;
*** – достоверность различий между контрольной и 4 группой <0,05.

Таблица 5.2.5. - Влияние сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на гематологические показатели крови у крыс после трехмесячного внутрижелудочного введения (M±m)

Исследуемые показатели	Контроль (n=10)	Фитоэкстракт 300 мг/кг (n=10)	Фитоэкстракт 600 мг/кг (n=10)	Фитоэкстракт 900 мг/кг (n=10)
Гемоглобин, г/л	118,6±0,65	121,2±0,96	120,8±0,81	120,7±0,79
	120,8±0,77	123,5±0,83	123,5±0,90	125,1±0,86
Гематокрит, %	41,3± 1,1	40,3± 0,5	42,5± 1,6	42,1± 1,8
	42,7± 1,05	43,2± 1,1	42,4± 1,05	43,8± 0,75
Эритроциты, 10^{12}/л	7,61±0,10	7,95±0,12	8,03±0,16	8,11±0,20
	8,06±0,08	8,6±0,11	8,65±0,15	8,62±0,19
Лейкоциты, 10^{9}/л	8,07±0,15	7,84±0,09	7,79±0,05	7,78±0,08
	8,31±0,11	8,54±0,08	8,99±0,14**	9,94±0,13***
Лимфоциты, %	60,27 ± 1, 5	64,57± 1,4	62,3 ± 1,15	61,6 ± 1,15
	62,5 ± 1,3	66,70 ± 1,35	68,8 ± 1,05	67,55 ± 1,5
СОЭ, мм/час	1,5 ± 0,15	1,7 ± 0,34	1,8 ± 0,95	1,65 ± 0,7
	1,65 ± 0,1	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,05	1,7 ± 0,5
Цветной показатель	0,899±0,004	0,900±0,006	0,899±0,008	0,893±0,01
	0,905±0,004	0,911±0,006	0,915±0,006	0,97±0,008

Примечание:
* – достоверность различий между контрольной и 6 группой <0,05;
** – достоверность различий между контрольной и 7 группой <0,05;
*** – достоверность различий между контрольной и 8 группой <0,05.

Статистический обсчет представленных в таблицах данных, проведенный с использованием критерия Стьюдента для множественных сравнений при $p \leq 0,05$ показал, что при сравнении гематологических показателей экспериментальных животных групп, получавших сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в дозах 300 мг/кг, 600 мг/кг и 900 мг/кг, с

контрольной группой экспериментальных животных выявлено некоторое увеличение количества гемоглобина и эритроцитов в периферической крови. Однако эти изменения были статистически недостоверны и не выходили за пределы физиологической нормы.

Месячное введение экспериментальным животным изучаемого фитэкстракта в дозах 300 мг/кг, 600 мг/кг и 900 мг/кг привело к достоверному увеличению количества лейкоцитов в периферической крови. При введении фитоэкстракта в течение трех месяцев также было выявлено достоверное увеличение количества лейкоцитов (табл. 5.2.5).

Все остальные гематологические показатели у животных контрольных и опытных групп находились в пределах физиологических норм [264, 265].

Влияние сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на основные биохимические показатели сыворотки крови

Для оценки воздействия изучаемого фитоэкстракта на основные метаболические процессы в организме был использован биохимический анализ сыворотки крови животных, результаты которого отражены в таблицах 5.2.6 и 5.2.7.

Таблица 5.2.6. - Влияние сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на биохимические показатели крови у крыс после месячного внутрижелудочного введения (M±m)

Исследуемые показатели	**Контроль (n=10)**	**Фитоэкстракт 300 мг/кг (n=10)**	**Фитоэкстракт 600 мг/кг (n=10)**	**Фитоэкстракт 900 мг/кг (n=10)**
Общий белок, г/л	68,6±0,37	80,67±0,57*	80,6±0,45**	80,94±0,35***
Холестерин общий, ммоль/л	2,2± 0,007	1,91± 0,04	1,72± 0,04**	1,59 ± 0,04***
Глюкоза, ммоль/л	4,97±0,13	3,30±0,12	3,85±0,07**	3,63±0,1***
Мочевина, ммоль/л	8,16±0,11	7,35±0,11	6,9±0,1	6,89±0,09
Креатинин, мг/дл	0,48 ± 0,004	0,5± 0,004	0,5 ± 0,001	0,5 ± 0,004

Примечание: * – достоверность различий между контрольной и 2 группой;
** – достоверность различий между контрольной и 3 группой;
*** – достоверность различий между контрольной и 4группой.

Таблица 5.2.7. - Влияние сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на биохимические показатели крови у крыс после трехмесячного внутрижелудочного введения (M±m)

Исследуемые показатели	Контроль (n=10)	Фитоэкстракт 300 мг/кг (n=10)	Фитоэкстракт 600 мг/кг (n=10)	Фитоэкстракт 900 мг/кг (n=10)
Общий белок, г/л	68,84±0,5	82,21±0,85*	81,91±0,59**	82,33±0,66***
Холестерин общий, ммоль/л	2,12± 0,007	1,81± 0,05	1,72± 0,04**	1,61 ± 0,05***
Глюкоза, ммоль/л	4,91±0,05	3,99±0,06	3,69±0,07**	3,79±0,06***
Мочевина, ммоль/л	8,08±0,09	7,13±0,06	7,76±0,01	7,77±0,08
Креатинин, мг/дл	0,47 ± 0,01	0,49± 0,004	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,005

Примечание:
* – достоверность различий между контрольной и 6 группой;
** – достоверность различий между контрольной и 7 группой;
*** – достоверность различий между контрольной и 8 группой.

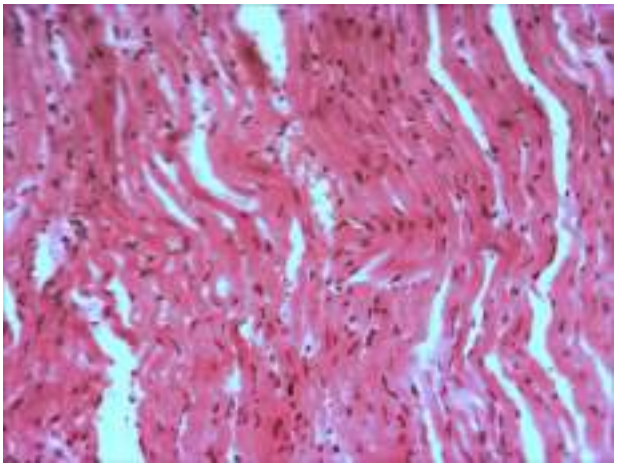
Таким образом, в ходе эксперимента установлено, что при введении фитоэкстракта Padus Grayanae Maxim в изучаемых дозах в течение 30 и 90 суток увеличивалось количество общего белка в сыворотке крови и уменьшались количество глюкозы и холестерина. При этом следует отметить, что изменения количеств указанных метаболитов не выходили за пределы физиологической нормы для данного вида животных [264, 265].

Все остальные биохимические показатели у животных контрольных и опытных групп отличий не имели

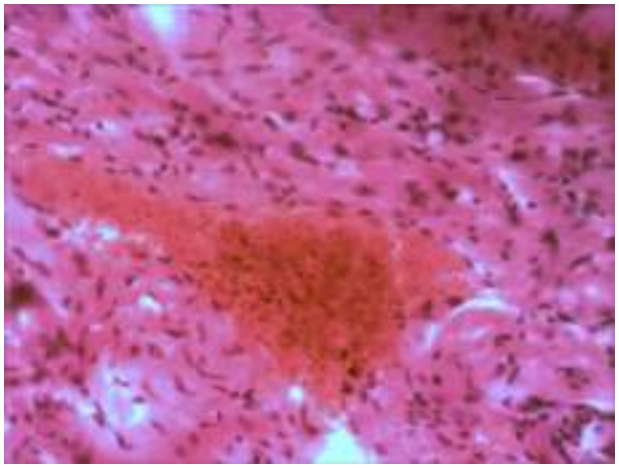
Результаты изучения влияния сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на морфо-функциональное состояние внутренних органов экспериментальных животных при введении 300, 600 и 900 мг/кг в течение 1 месяца

При просмотре гистологических препаратов изучаемых органов животных из контрольной группы и группы, получавшей сухой экстракт экстракт Padus Grayanae Maxim в дозе 300 мг/кг в течение 1 месяца существенных изменений во всех внутренних органах не наблюдалось.

Так структуры сердца остались без видимых изменений. Местами наблюдалось кровенаполнение сосудов (микрофото 5.2.1 и 5.2.2).



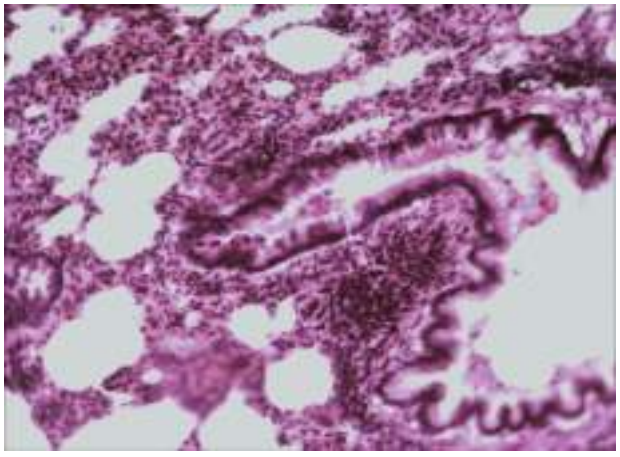
Микрофото 5.2.1. Миокард интактной крысы. Окраска-гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.20.



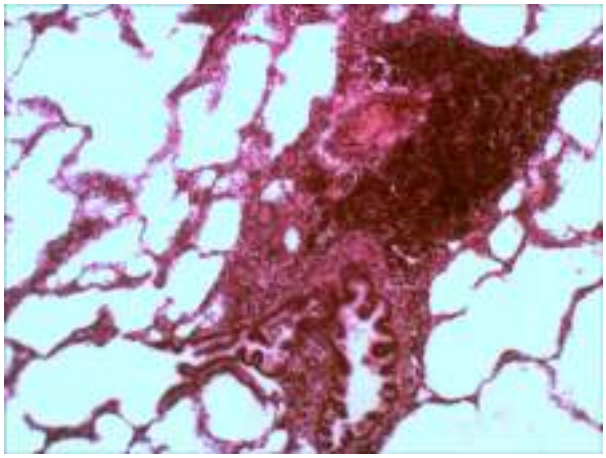
Микрофото.5.2.2. Миокард крысы, получавшей изучаемый фитоэкстракт. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.20.

На микрофото 5.2.2 виден сосуд в миокарде крысы, получавшей изучаемый фитоэкстракт, наполненный кровью.

В легких структура органа сохранялась, но в стенке бронхов было обнаружено некоторое увеличение лимфоидных фолликулов (микрофото 5.2.3 и 5.2.4)



Микрофото 5.2.3. Легкое интактной крысы. Лимфоидные фолликулы в слизистой оболочке. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. Ок.7.Об.20.



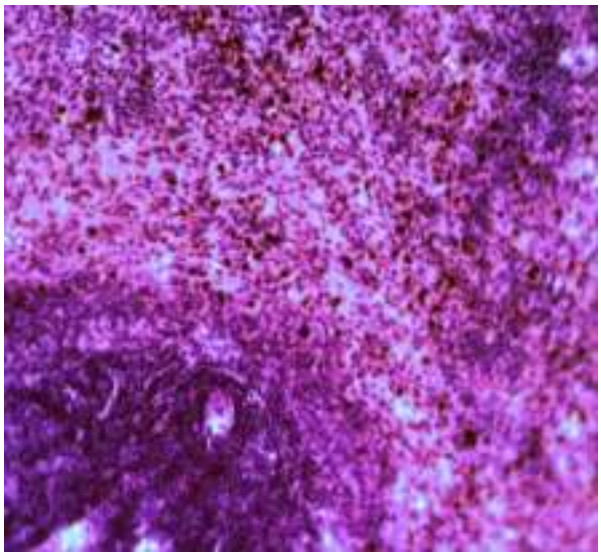
Микрофото 5.2.4. Увеличенный лимфоидный фолликул в стенке бронха крысы, получавшей изучаемый фитоэкстракт. Окраска: гематоксилин эозин. Ув.Ок.7.об.10.

В желудке, в отделе тонкого и толстого кишечника слизистая оболочка была без изменений, подслизистая состояла из рыхлой волокнистой не оформленной соединительной ткани, мышечная оболочка состоит из гладких миоцитов, расположенных в разном направлении, серозная оболочка без особенностей.

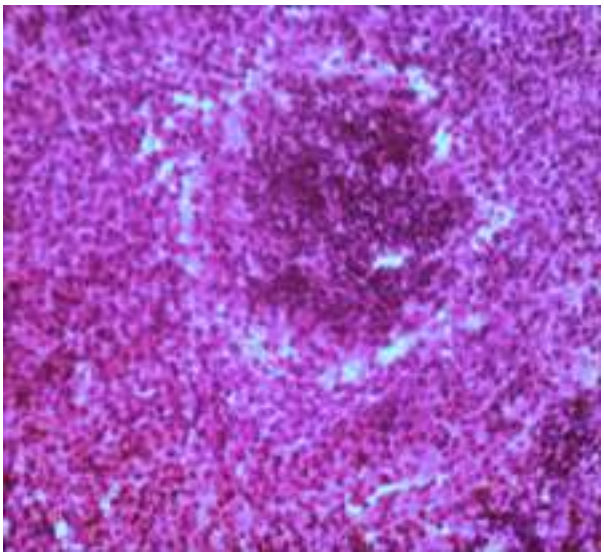
Печень и поджелудочная железа сохраняли обычное строение. В печени крыс, получавших сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в дозе 300 мг/кг в течение 1 месяца, наблюдалось кровенаполнение кровеносных сосудов**.**

В почке и надпочечниках у животных контрольной и опытной группы изменений также не выявлено**.**

В селезенке животных, получавших изучаемый фитоэкстракт по сравнению с интактными животными, белая пульпа занимала большие пространства по сравнению с красной, а в лимфоидных фолликулах наблюдались выраженные реактивные центры **(**микрофото 5.2.5 и 5.2.6).

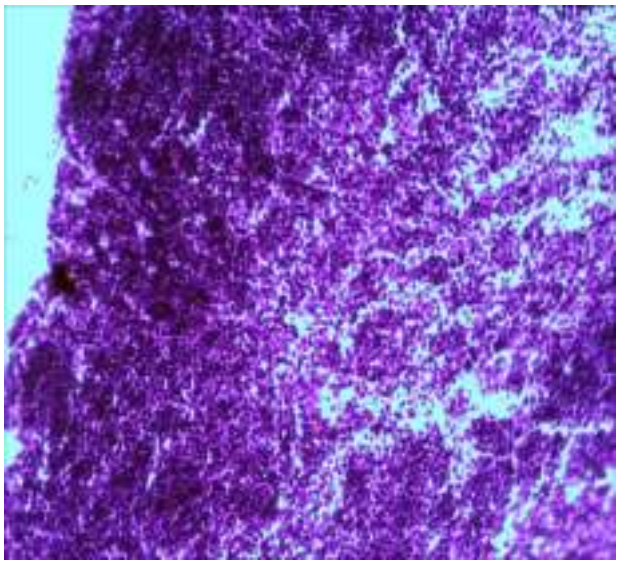


Микрофото 5.2.5. Корковое и мозговое вещество селезенки интактной крысы. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.10.

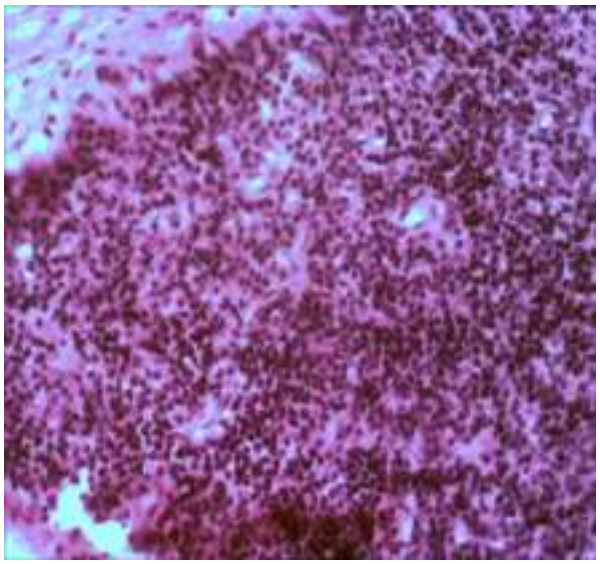


Микрофото 5.2.6. Увеличенный лимфоидный фолликул с большим реактивным центром в селезенке крысы опытной группы. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7Об.20.

В тимусе у крыс опытной группы была сглажена граница коркового и мозгового вещества (микрофото 5.2.7 и 5.2.8).



Микрофото 5.2.7. Вилочковая железа интактной крысы. Корковое и мозговое вещество тимуса. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7Об.10.



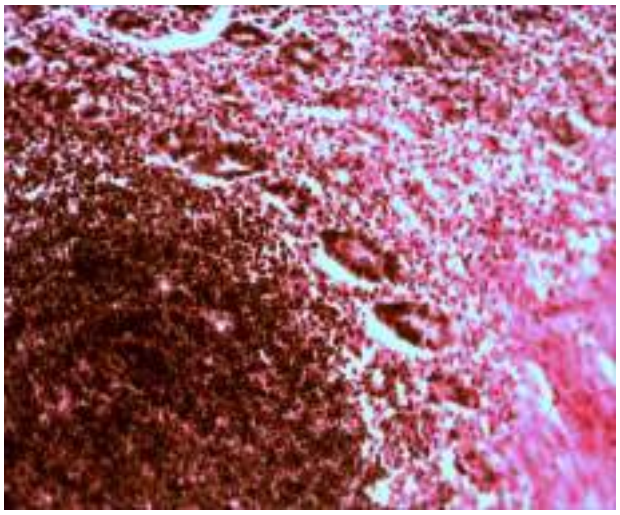
Микрофото 5.2.8. Тимус крысы опытной группы, стертая граница коркового и мозгового вещества. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7Об.20.

Таким образом воздействие на животных изучаемого фитоэкстракта **в дозе 300 мг/кг в течение одного месяца** не вызывало особых изменений в структурах изученных органов. Исключение составили органы, где имелась лимфоидная ткань (легкие, селезенка и тимус), в которых имело место увеличение количества лимфоцитов в структурах.

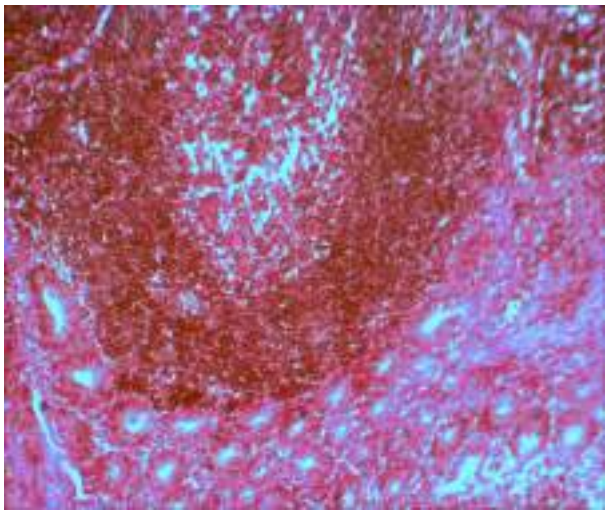
При анализе гистологических препаратов изучаемых органов животных из контрольной группы и группы животных, получавшей сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в дозе 600 мг/кг в течение 1 месяца, в легких в стенке бронхов увеличились в размерах лимфоидные фолликулы. Они занимали значительные пространства заходя в подслизистую оболочку. В сердце отмечалось расширение сосудов и наполнение их кровью.

В органах пищеварительной системы в желудке слизистая оболочка у крыс опытной группы не отличалась от контрольных животных, содержит простые не разветвленные трубчатые железы обычного клеточного состава.

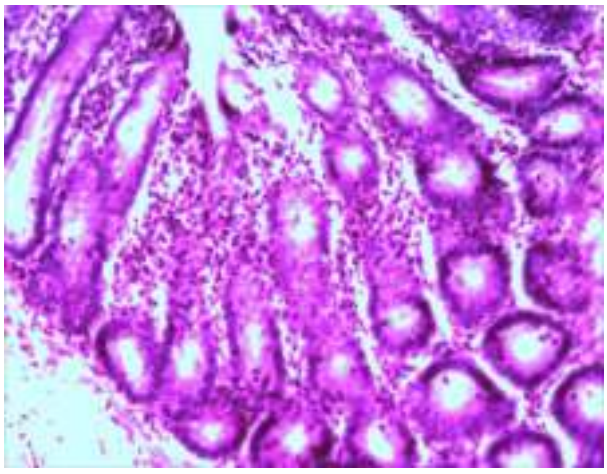
В отделах тонкого кишечника слизистая оболочка не изменена. В толще стенки тонкого и толстого кишечника у животных, получавших изучаемый фитоэкастракт, залегают лимфоидные фолликулы больших размеров, занимая слизистую, подслизистую оболочки и местами проникая в мышечную оболочку. Реактивные центры таких фолликулов увеличены (микрофото 5.2.9, 5.2.10, 5.2.11, 5.2.12).



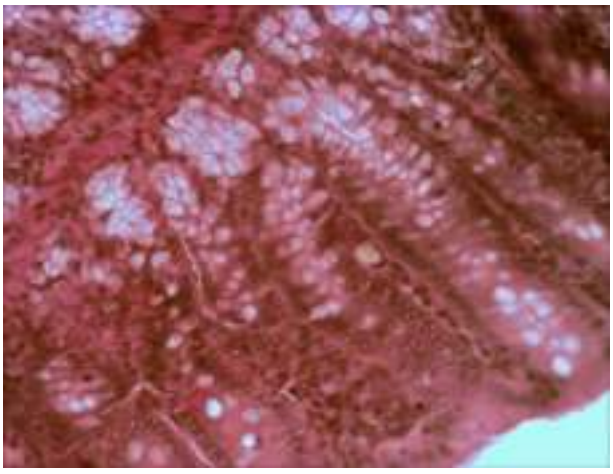
Микрофото 5.2.9. Лимфоидный фолликул в слизистой оболочке тонкого кишечника интактной крысы. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.20.



Микрофото 5.2.10. Огромный лимфоидный узелок в толще стенки тонкого отдела кишечника крысы опытной группы. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.10.

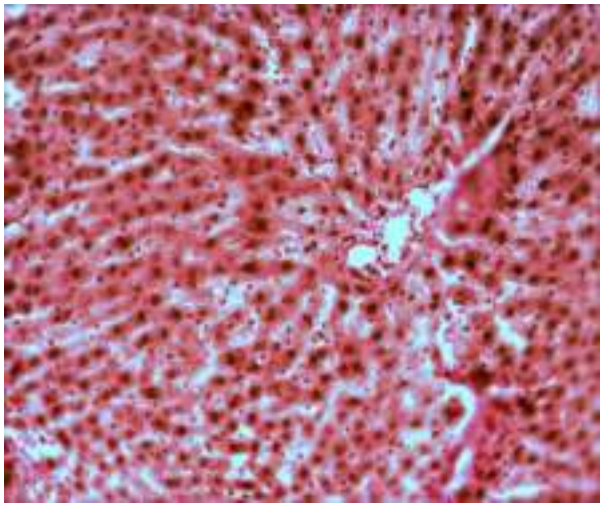


Микрофото 5.2.11. Толстый кишечник интактной крысы. Слизистая и подслизистая оболочки. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.20.

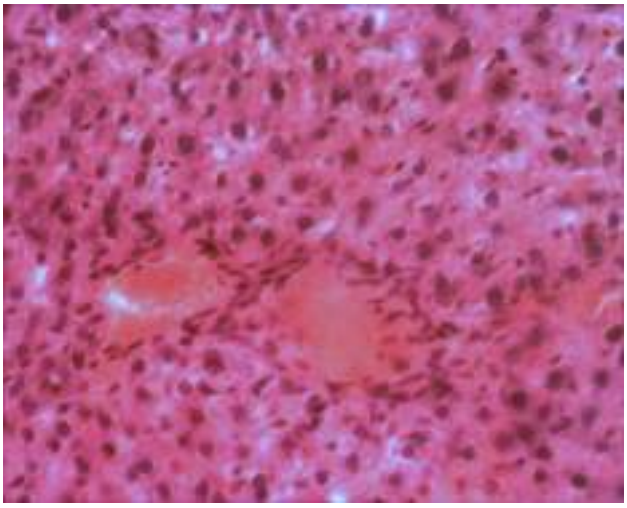


Микрофото 5.2.12. Отдел толстого кишечника крысы опытной группы, видны крипты, строма слизистой оболочки инфильтрирована лимфоцитами. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7Об.20.

Печень обычного строения. Вокруг центральной вены расположены перекладины, образованные гепатоцитами нормального строения между ними синусоидные капилляры. Кровеносные сосуды и синусоидные капилляры печени расширены и заполнены кровью (микрофото 5.2.13 и 5.2.14).



Микрофото 5.2.13. Печень интактной крысы. Видны печеночные перекладины, образованные гепатоцитами, между ними синусоидные капилляры. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. Ок.7.Об.20.



Микрофото 5.2.14. Печень крысы опытной группы. Кровеносные сосуды и синусоидные капилляры расширены и заполнены кровью. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7Об.20.

Поджелудочная железа дольчатого строения. Дольки образованы ацинусами, между ними выводные протоки. В паренхиме расположены разных размеров островки Лангерганса.

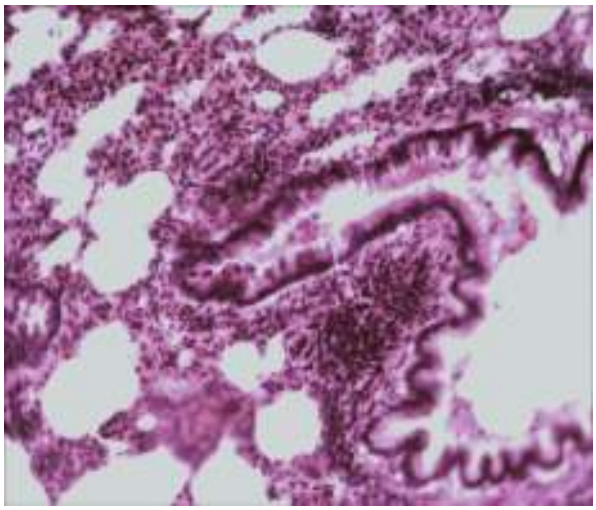
В селезенке и тимусе площадь лимфоидной ткани увеличена.

Таким образом**,** введение экспериментальным животным сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в дозе 600 мг/кг в течение 1 месяца структуру изученных органов не изменило. Реакция на изучаемый фитоэкстракт выявила значительную активность лимфоидной ткани, которая выражалась в увеличении лимфоидных узелков в толще пищеварительной трубки, инфильтрации лимфоцитами стромы слизистой оболочки кишечника, увеличении белой пульпы селезенки, активации реактивных центров лимфоидных узелков и стирания границы слоев (коркового и мозгового) в

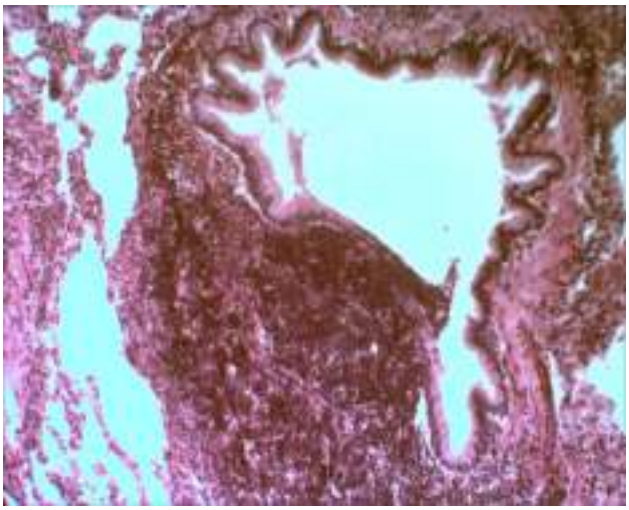
тимусе. Во всех изученных органах наблюдалось расширение кровеносных сосудов и наполнение их кровью.

При гистологическом исследовании строения органов экспериментальных животных, получавших сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в дозе 900 мг/кг, в сердце, печени, почках, надпочечниках выявлялись расширенные кровеносные сосуды, заполненные кровью. Нарушений морфологического строения в указанных органах не выявлено.

В органах дыхательной системы в стенке бронхов обнаружены лимфоидные фолликулы больших размеров, расположенные во всех оболочках мелких бронхов (микрофото 5.2.15 и 5.2.16).

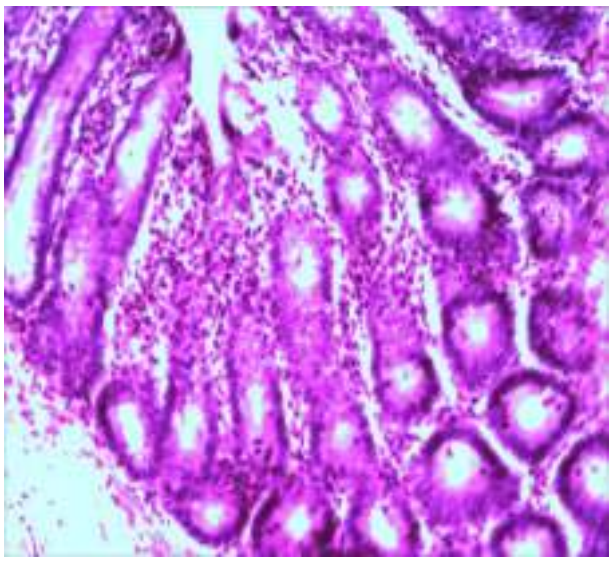


Микрофото 5.2.15. Легкое интактной крысы. Лимфоидные фолликулы в слизистой оболочке. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. Ок.7.Об.20.

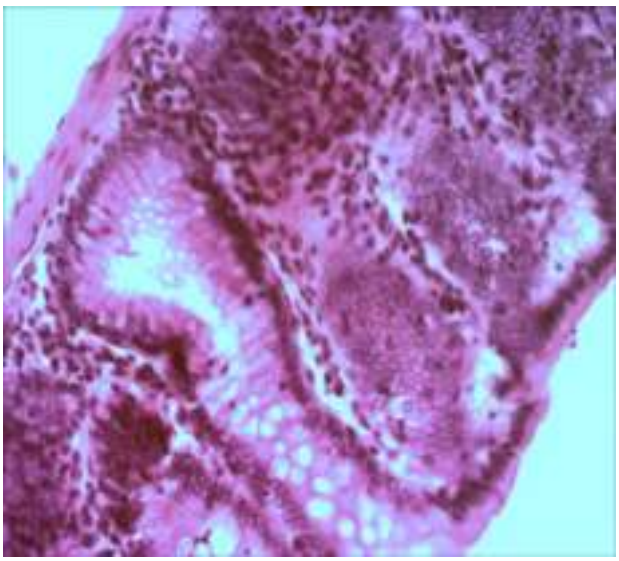


Микрофото 5.2.16. Лимфоидный узелок значительных размеров в стенке бронха крысы опытной группы. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7Об.10.

В органах пищеварительной системы у животных опытной группы в желудке выявлена инфильтрация лимфоцитами собственной пластинки слизистой оболочки. В отделе тонкого кишечника отмечалось некоторое истончение структур слизистой оболочки, неглубокие крипты, ворсинки небольших размеров. В отделе толстого кишечника большие скопления лимфоидных фолликулов - пейеровы бляшки. В собственной пластинке слизистой между криптами расположены скопления лимфоцитов (микрофото 5.2.17 и 5.2.18).



Микрофото 5.2.17. Толстый кишечник интактной крысы. Слизистая и подслизистая оболочки. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.20.



Микрофото 5.2.18. Слизистая оболочка толстого отдела кишечника крысы опытной группы. Лимфоидный узелок и инфильтрация собственной пластинки лимфоцитами. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.40.

В селезенке обнаружено большое количество лимфоидных узелков, в центре которых лежат активные центры размножения.

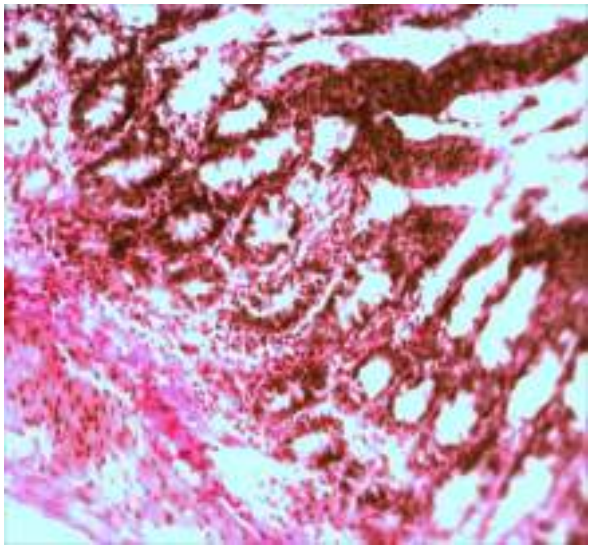
В тимусе сглажена граница между корковым и мозговым веществом. Выявляется большое количество лимфоцитов как в корковом, так и в мозговом слое.

Таким образом, результаты исследования морфофункционального состояния внутренних органов крыс, получавших сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в дозе 900 мг/кг в течение одного месяца не выявили существенных нарушений их структуры.

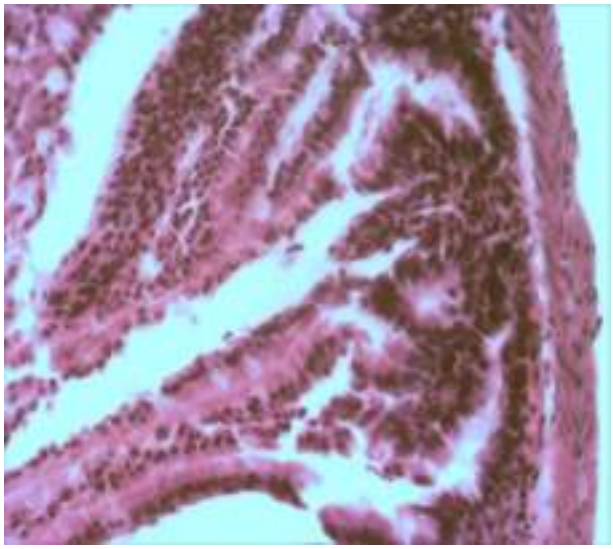
Реакция на введение изучаемого фитоэкстракта в указанной дозировке в сравнении с группой животных, получавших фитоэкстракт в дозе 600 мг/кг, проявлялась более выраженным кровенаполнением органов (расширенные кровеносные сосуды). В легких увеличились скопления лимфоидных узелков в стенке мелких бронхов. В органах пищеварительной системы (желудок, отделы тонкого и толстого кишечника) усилилась активность лимфоидной ткани, как в фолликулах, так и в собственной пластинке слизистой оболочки.

Результаты изучения влияния сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на морфо-функциональное состояние внутренних органов экспериментальных животных при введении 300, 600 и 900 мг/кг в течение 3 месяцев

У животных, получавших изучаемый фитоэкстракт в дозе 300 мг/кг в течение 3 месяцев, в органах пищеварительной системы, дыхательной и кроветворной системы отмечалось увеличение лимфоидной ткани, инфильтрация лимфоцитами стромы органов (микрофото 5.2.19 и 5.2.20).



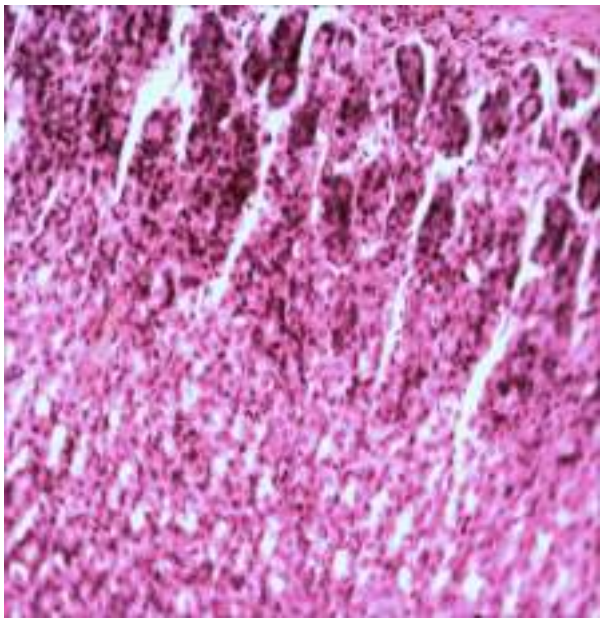
Микрофото 5.2.19. Слизистая оболочка тонкого кишечника интактной крысы. Видны ворсинки и крипты. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.20.



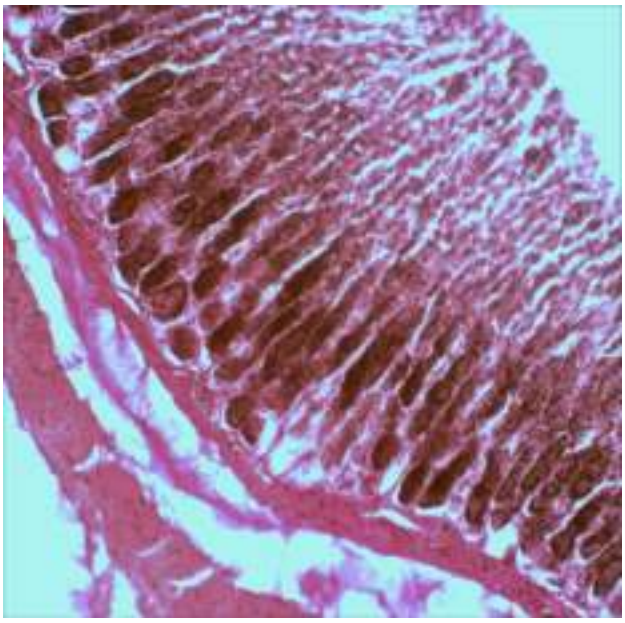
Микрофото 5.2.20. Слизистая оболочка тонкого кишечника крысы опытной группы. Инфильтрация стромы лимфоцитами. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.20.

В селезенке лимфоидные узелки увеличивались в размерах, реактивные центры были раздражены**.** В тимусе граница коркового и мозгового слоев не определялась.

В желудке выявлено утолщение слизистой оболочки, в тонком кишечнике уменьшение глубины крипт и истончение ворсинок (микрофото 5.2.21 и 5.2.22).



Микрофото 5.2.21. Слизистая оболочка желудка интактной крысы. Окраска: гематоксилин – эозин. Ув. Ок.7. Об.20.



Микрофото 5.2.22. Утолщение слизистой оболочки желудка у крысы опытной группы. Окраска: гематоксилин - эозин. Ув.Ок.7. Об.10.

Изучение морфо-функционального состояния внутренних органов у животных, которым сухой экстракт Padus Grayanae Maxim вводили в дозе 600 мг/кг в течение 3 месяцев позволило установить, что в исследованных органах патологических изменений не обнаружено.

В органах, содержащих лимфоидные фолликулы, наблюдалось увеличение их объема и появление активных реактивных центров.

В органах пищеварительной системы, в желудке было отмечено утолщение слизистой оболочки, а в тонком кишечнике - истончение слизистой. В отделах тонкого и толстого кишечника наблюдалось увеличение лимфоидной ткани и инфильтрация лимфоцитами собственной пластинки слизистой.

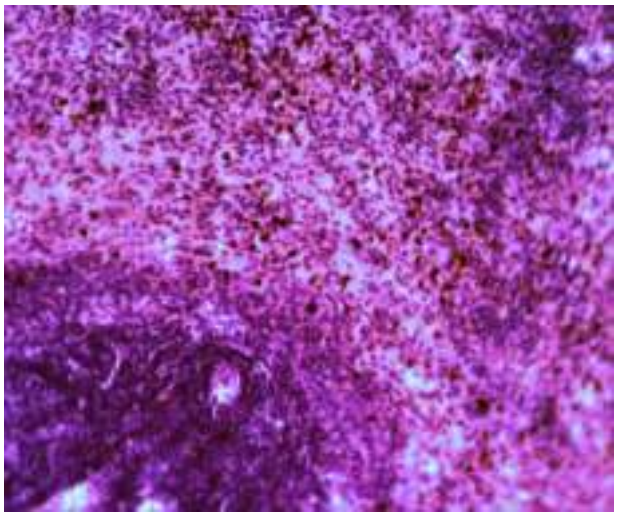
В тимусе выявлялась стертая граница слоев. Во всех исследованных органах наблюдалось значительное расширение кровеносных сосудов.

В селезенке отмечались огромные лимфоидные узелки с реактивными центрами, уменьшение площади красной пульпы.

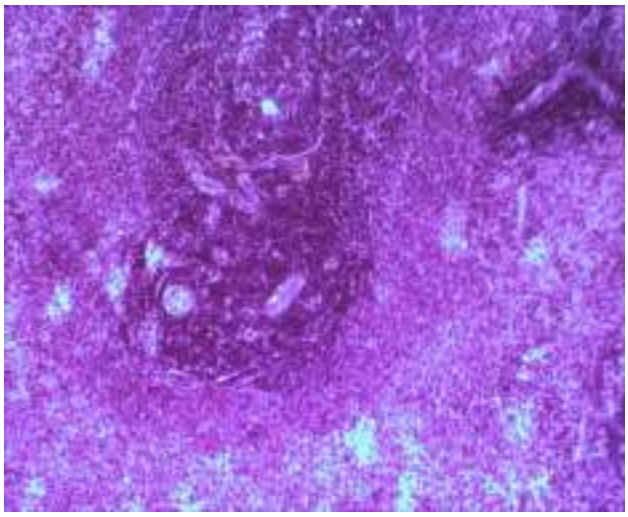
При микроскопическом исследовании внутренних органов экспериментальных животных, которым вводили сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в дозе 900 мг/кг в течение 3 месяцев, показало, что в исследованных органах патологических изменений также не обнаружено.

Как и у животных, получавших изучаемый экстракт в дозах 300 и 600 мг/кг, в органах, содержащих лимфоидные фолликулы, наблюдалось увеличение их площади и появление реактивных центров.

Особенно наглядно это было выражено в селезенке (микрофото 5.2.23 и 5.2.24), лимфоидных фолликулах пищеварительной трубки и в стенке бронхов.



Микрофото 5.2.23. Селезенка интактной крысы. Корковое и мозговое вещество селезенки. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.10.

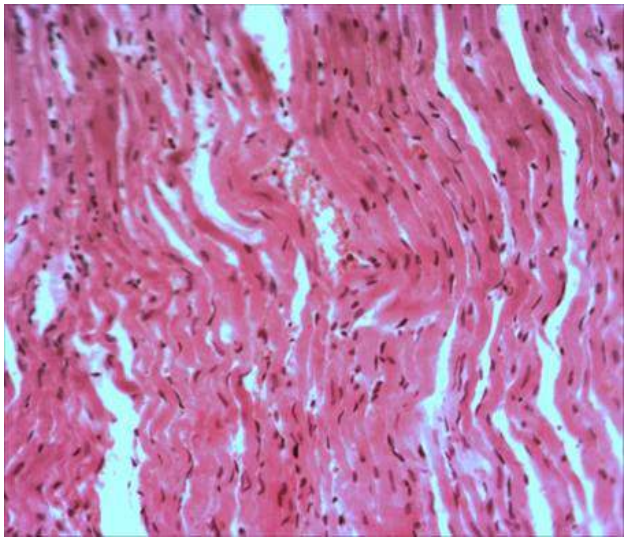


Микрофото 5.2.24. Увеличенные в размерах сливающиеся лимфоидные фолликулы селезенки у крысы опытной группы. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.10.

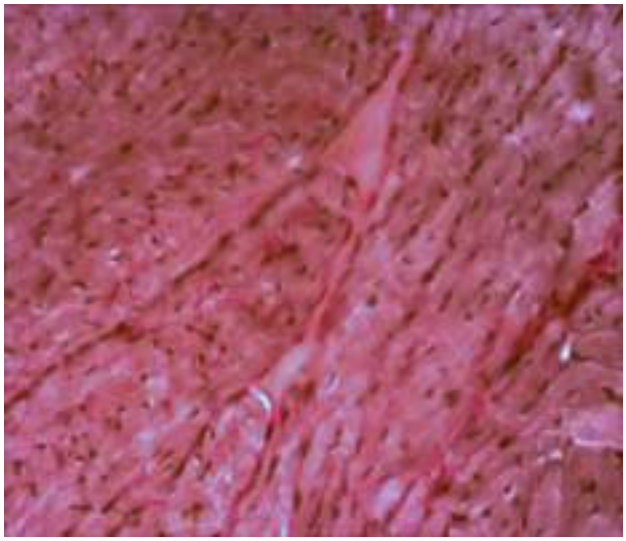
В тимусе граница между корковым и мозговым слоем не определялась.

Собственная пластинка слизистой оболочки желудка, отделов тонкого и толстого кишечника была инфильтрирована лимфоцитами. В желудке слизистая была несколько утолщена, а в отделах тонкого кишечника - была истончена.

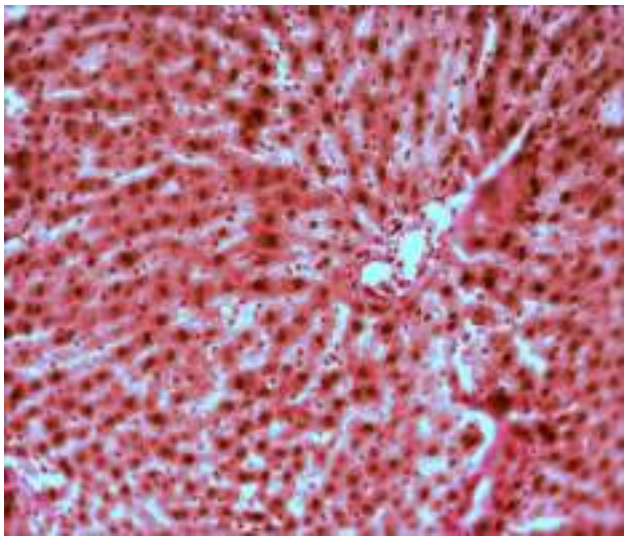
Кровеносные сосуды во всех изученных органах были значительно расширены и заполнены кровью (микрофото 5.2.25, 5.2.26, 5.2.27, 5.2.28).



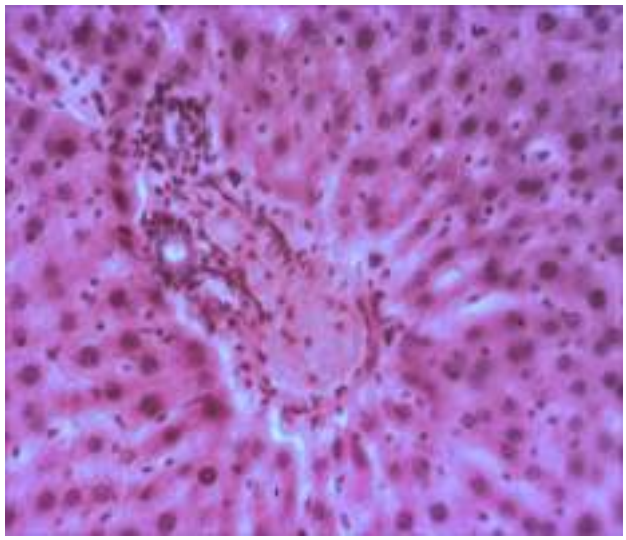
Микрофото 5.2.25. Миокард интактной крысы. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.20.



Микрофото 5.2.26. Расширенные сосуды в миокарде сердца крысы опытной группы. Окраска: по Ван Гизон.Ув.Ок.7.Об.20.



Микрофото 5.2.27. Печень интактной крысы. Видны печеночные перекладины, образованные гепатоцитами, между ними синусоидные капилляры. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув. Ок.7.Об.20.



Микрофото 5.2.28. Печень крысы опытной группы. Расширенные сосуды печени, лимфоидная инфильтрация по ходу сосуда. Окраска: гематоксилин-эозин. Ув.Ок.7.Об.40.

Таким образом, по результатам патоморфологических и гистологических исследований по изучению влияния сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на морфо-функциональное состояние внутренних органов экспериментальных животных можно сделать следующие выводы:

- внутрижелудочное введение исследуемого фитоэкстракта в изученных дозировках в течение 1 и 3 месяцев не оказывало местнораздражающего действия на пищевод, желудок и кишечник;
- по результатам патоморфологических и гистологических исследований не зарегистрировано развития дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений в паренхиматозных клетках и строме внутренних органов при введении сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в исследованных дозах;
- реакция на введение изучаемого фитоэкстракта проявлялась увеличением кровенаполнения внутренних органов. В органах, содержащих лимфоидные фолликулы, наблюдалось увеличение их площади и появление реактивных центров;
- при морфологическом исследовании стимулирующее действие изучаемого фитоэкстракта на функцию лимфоидной ткани лучше всего проявилось у животных, получавших его в дозе 600 мг/кг в течение 1 месяца.

5.3. Изучение мутагенных свойств сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Изучение мутагенных свойств является одним из обязательных исследований на этапе доклинического изучения новых ЛС. Эти исследования проводятся с целью определения риска в отношении повреждения ДНК и фиксации этих повреждений ДНК в форме генных мутаций.

Исследования генотоксичности веществ проводятся как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* с целью выявления компонентов, индуцирующих генетическое повреждение ДНК вследствие различных механизмов.

При использовании метода оценки генных мутаций на клетках млекопитающих в условиях *in vitro* наиболее часто используются следующие культуры: мышиная лимфома L5178Y, клеточные линии CHO, AS52, и V79 китайского хомячка; лимфобластные клетки человека TK6 [235, 266, 267]. Клетки мышиной лимфомы L5178Y активно используются в связи с тем, что они являются чувствительными индикаторами мутагенной активности широкого спектра химических соединений в микроядерном тесте и характеризуются высокой стабильностью и низким уровнем спонтанного образования микроядер.

Диапазон исследуемых концентраций изучаемого фитоэкстракта составил от 1,25 мг/мл до 0,039 мг/мл. Выбор концентраций проводился по методике согласно руководству [234, 268]. Последующие концентрации исследуемого вещества были приготовлены в среде для воздействия путем серийных разведений. Анализ проводился с использованием 4 часовой экспозиции с метаболической активацией и без метаболической активации. Для метаболической активации использовали смесь ферментов из постмитохондриальной фракции гепатоцитов крыс S9, содержащую 54 мг глюкоза-6-фосфата, 0,6 мл стерильной дистиллированной воды, 7,5 мг НАДФ, 0,3 мл 150 мМ раствора KCl и 0,6 мл S9-фракции.

Для того, чтобы установить, может ли исследуемое вещество или его метаболиты взаимодействовать с ДНК клеток млекопитающих *in vitro* и приводить к ее повреждению с последующим появлением микроядер клетки инкубировались с исследуемым веществом 4 ч при 37°C, 5% CO_2. Положительным контролем при воздействии с метаболической активацией служил Циклофосфамид в конечной концентрации 10 мкг/мл, при воздействии без метаболической активации – Митомицин С в конечной концентрации 0,1 мкг/мл.

После окончания периода воздействия клетки отмывали центрифугированием в среде для отмывания при 130g в течение 5 минут, добавляли среду для воздействия и инкубировали 20 ч при 37 °C, 5 % CO_2. По окончании восстановительного периода клетки ресуспендировали, потом из ячеек отбирали по 20 мкл клеточной суспензии для подсчета с трипановым синим.

Клетки отмывали центрифугированием, отбирали супернатант и добавляли раствор для гипотонического шока и инкубировали в течение 10 мин при 37°C, 5% CO_2. После окончания инкубации отбирали супернатант, ресуспендировали клетки и добавляли фиксатор. Фиксировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Наносили 8-10 капель на предметное стекло.

После того как предметные стекла с образцами высыхали, предметные стекла с образцами окрашивали 3 % раствором Гимзы, в течение 8 минут. Подсчитывали микроядра в 1000 одноядерных клетках на окрашенном предметном стекле при помощи люминесцентного микроскопа DM2500 (Leica).

Изучение мутагенности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim проводили с помощью метода учета образования микроядер. Результаты изучения индукции образования микроядер изучаемым фитоэкстрактом представлены в таблицах 5.3.1 и 5.3.2.

Таблица 5.3.1 – Результаты микроядерного анализа сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в условиях *in vitro* без метаболической активации в культуре клеток L5178Y

Исследуемое вещество	Концентрация	Среднее кол-во микроядер на 1000 клеток	P_F	P_S
Вода очищенная	0	0	-	-
Митомицин	0,1 мкг/мл	7,5±0,7	0,015*	0,04*
Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim	0,039 мг/мл	0,7±0,5	1	0,5
	0,078 мг/мл	1±0	1	0,5
	0,156 мг/мл	0,5±0,7	1	0,5
	0,312 мг/мл	0,5±0,7	1	1
	0,625 мг/мл	0,5±0,7	1	1
	1,25 мг/мл	1±0	1	0,5

Примечание:
* $p< 0,05$; P_F – значение p по Фишеру, Ps – значение p по Стьюденту.

В качестве позитивного контроля использовали известный мутаген – митомицин С. Частота образования микроядер при этом составляет 7,5 на 1000 проанализированных клеток, а разница статистически достоверна при проверке гипотезы двумя критериями – по Фишеру и Стьюденту.

Из представленных в таблице 5.3.1 результатов по оценке способности индуцировать образование микроядер следует, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в микроядерном тесте без метаболической активации генотоксичностью не обладает.

В результате проведения микроядерного анализа сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в условиях *in vitro* с метаболической активацией фракцией S9 в культуре клеток L5178Y было установлено, что и после метаболической активации изучаемого фитоэкстракта исследование его мутагенного потенциала дало также отрицательный результат (табл. 5.3.2).

Таблица 5.3.2 – Результаты микроядерного анализа сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в условиях *in vitro* с метаболической активацией фракцией S9 в культуре клеток L5178Y

Исследуемое вещество	Концентрация	Среднее кол-во микроядер на 1000 клеток	P_F	P_S
Вода очищенная	0	0	-	-
Циклофосфамид	10 мкг/мл	12,0±1,4	0,0004*	0,05**
Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim	0,039 мг/мл	3,0±1,4	0,25	0,02
	0,078 мг/мл	3±0	0,25	1
	0,156 мг/мл	3,5±0,7	0,25	0,5
	0,312 мг/мл	1,5±0,7	1	0,1
	0,625 мг/мл	2,0±1,4	0,5	0,7

Примечание:
* $p < 0,0001$;
** $p \leq 0,05$;
P_F – значение p по Фишеру,
Ps – значение p по Стьюденту.

Как видно из таблицы 5.3.2, исключение составила минимальная концентрация фитоэкстракта в 0,039 мг/мл. В результате проверки достоверности полученных результатов критериям Фишера и Стьюдента, последний показал достоверность с $p = 0,02$. Принимая во внимание данные проверки результатов критерием Фишера со значением $p = 0,25$, можно с определенной уверенностью утверждать, что мутагенная активность после метаболической активации изучаемого фитоэкстракта фракцией S9 отсутствует.

При этом в позитивном контроле с циклофосфамидом, известным алкилирующим ДНК-агентом, количество микроядер на 1000 проанализированных клеток составляет 12, что статистически достоверно отличается, как от негативного контроля, так и опытных образцов изучаемого фитоэкстракта.

Таким образом, результаты изучения мутагенной активности фитоэкстракта микроядерным тестом на культуре клеток L5178Y как в условиях метаболической активации цитохромами микросомальной фракции печени крыс, так и без таковой, позволяют сделать заключение об отсутствии способности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim вызывать нарушения в хромосомном аппарате клеток.

Заключение по 5 главе.

В результате проведенных доклинических исследований впервые получены данные о фармако-токсикологических свойствах сухого экстракта Padus Grayana Maxim.

Изучение острой токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на мышах и крысах при оральном пути введения позволяет отнести изучаемый фитоэкстракт к 5 классу токсичности по международной системе классификации токсичности веществ (GHS).

Изучение профиля безопасности фитоэкстракта Padus Grayanae Maxim в дозах 300, 600 и 900 мг/кг в течение 30 и 90 суток не выявило отрицательного влияния изучаемого фитоэкстракта на общее состояние, массу тела, показатели периферической крови, биохимические параметры сыворотки крови и морфологическую картину внутренних органов экспериментальных животных.

Анализ результатов изучения мутагенной активности фитоэкстракта микроядерным тестом на культуре клеток L5178Y как в условиях метаболической активации цитохромами микросомальной фракции печени крыс, так и без таковой, позволяют сделать заключение об отсутствии способности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim вызывать нарушения в хромосомном аппарате клеток.

ГЛАВА 6
ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУХОГО ЭКСТРАКТА PADUS GRAYANAE MAXIM

6.1. Изучение специфической фармакологической активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на экспериментальной модели стафилококковой инфекции у мышей

Как известно, в клинической практике иммуномодуляторы применяют при многих заболеваниях: острых респираторных заболеваниях вирусной, бактериальной и смешанной природы; желудочно-кишечных заболеваниях, связанных с нарушением баланса микрофлоры; аутоиммунных и аллергических болезных и т.п. [269, 270, 271].

Механизмы действия иммуномодуляторов многообразны, одни из них стимулируют и активируют продукцию интерферонов альфа и гамма, которые обладают противовирусной и противоопухолевой активностью. Кроме того, ИФН-γ является плейотропным интерфероном, регулирующим огромный спектр иммунологических реакций [272, 273]. Особый интерес представляют БАВ, обладающие противовоспалительной активностью [274]. Это связано с тем, что избыточная стимуляция продукции провоспалительных цитокинов – интерферонов, ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-α, ИЛ-10 может спровоцировать так называемый «цитокиновый шторм», в результате которого развивается синдром полиорганной недостаточности приводящий к смерти пациента в самый кроткий период – всего несколько часов. В патогенезе этого синдрома лежат целый спектр заболеваний: инфекционно-токсический шок, сепсис, острый панкреатит, обширные ожоги и травмы и т.д. [275].

В связи с этим, изучение специфической активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim проводили по двум направлениям.

Первое направление исследований включало оценку влияния сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на неспецифическую резистентность у мышей. Здесь изучалась неспецифическая иммуностимулирующая активность изучаемого фитоэкстракта на инфекционной модели. Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в этой серии опытов вводили экспериментальным животным по профилактической схеме.

Второе направление исследований сухого экстракта Padus Grayanae Maxim состояло в его применении в терапии стафилококковой генерализованной инфекции у мышей, вызванной клиническим изолятом *Staphylococcus aureus*. При этом изучался лечебный противовоспалительный эффект на септической модели.

Оценка влияния сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на неспецифическую резистентность у мышей.

На первой стадии эксперимента животным всех 4-х групп в течение трёх суток внутрижелудочно однократно с помощью металлической иглы с оливой вводили изучаемый фитоэкстракт в дозах – 10 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг.

Рис. 6.1.1. Внутрижелудочное введение мышам раствора фитоэкстракта Padus Grayanae Maxim

На второй стадии эксперимента (на 4-е сутки) мышей заражали клиническим вирулентным изолятом *Staphylococcus aureus* в дозе $1,5\times10^9$ КОЕ/ на особь путем введения внутрибрюшинно (рис. 6.1.2) взвеси изолята в стерильной воде в объеме 0,2 мл [233].

Рис. 6.1.2. Внутрибрюшинное введение мышам взвеси изолята *Staphylococcus aureus*

Далее за животными наблюдали в течение 10 дней: отмечали смертность, динамику массы тела и клинические признаки развития стафилококковой инфекции.

В серии экспериментов по изучению влияния фитоэкстракта на течение стафилококковой инфекции по профилактической схеме были использованы 40 аутбредных белых мышей.

Анализ результатов наблюдения показал, что на вторые сутки после заражения у животных контрольной группы, а также у животных, получавших изучаемый фитоэкстракт в дозах доз 10 мг/кг и 100 мг/кг, отмечалась ярко-выраженная картина развития инфекционного процесса.

Уже через 3-4 часа после заражения животные становились малоподвижными, отказывались от еды, сбивались в кучу, большую часть суток спали, шерсть становилась сероватой и взъерошенной. На 2-6 сутки эксперимента отмечалась гибель животных (табл. 6.1.1).

В группе мышей, получавших 200 мг/кг исследуемого фитоэкстракта, также наблюдался падеж, однако клинические признаки инфекции были выраженными гораздо в меньшей степени: мыши плохо поедали корм, были малоподвижны, много спали.

Таблица 6.1.1 – Влияние сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на течение стафилококковой инфекции у мышей при введении по профилактической схеме (n=10)

Группа	Сутки наблюдения									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Контроль	0/10	3/10	4/10	3/10	-	-	-	-	-	-
10 мг/кг	0/10	2/10	3/10	4/10	1/10	-	-	-	-	-
100 мг/кг	0/10	1/10	3/10	3/10	2/10	-	-	-	-	-
200 мг/кг	0/10	0/10	1/10	2/10	1/10	-	-	-	-	-

Изучаемый фитоэкстракт в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг не оказал существенного влияния на смертность экспериментальных животных. К концу 5 суток все животные этих групп погибли. Хотя результаты клинического наблюдения выявили у животных этих групп более сглаженные симптомы развития стафилококковой инфекции.

В группе животных, получавших сухой экстракта Padus Grayanae Maxim в дозе 200мг/кг массы смертность мышей была снижена на 60 % по сравнению с контрольной группой (рис.6.1.3).

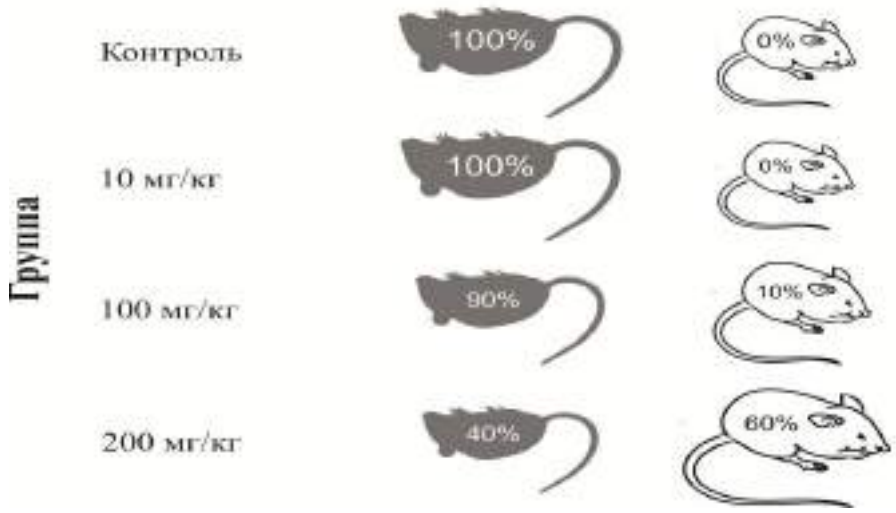


Рис. 6.1.3. Смертность мышей при стафилококковой инфекции при введении сухого экстракта Padus Grayanae Maxim по профилактической схеме (n=10)

Результаты изучения динамики массы тела у мышей с генерализованной стафилококковой инфекцией представлены в таблице 6.1.2.

Таблица 6.1.2. – Динамика массы тела мышей со стафилококковой инфекцией при введении сухого экстракта Padus Grayanae Maxim по профилактической схеме (n=10)

Группа	**Сутки наблюдения**			
	За 3 суток до заражения	В день заражения	5	10
Контроль	20,1±1,2	20,2±1,1	-	-
10 мг/кг	19,8±0,9	19,5±1,2	-	-
100 мг/кг	20,8±1,3	20,2±0,8	14,4±2,1	-
200 мг/кг	20,3±1,4	20,5±1,2	15,9±1,9	17,2±2,2

Из представленных данных видно, что в контрольной и 1 группе к концу 4 суток все животные погибли. Снижение массы тела мышей в группе животных, получавших изучаемый фитоэкстракт в дозе 100 мг/кг, на 5 сутки наблюдения после заражения было катастрофичным и составило более 30% от исходных значений. К 7 дню в этой группе выжила только одна мышь.

Исходя из принципов гуманности, в тот же день она была умерщвлена цервикальной дислокацией.

В группе животных, получавших изучаемый фитоэкстракт в дозе 200 мг/кг, снижение массы тела мышей на 5 сутки наблюдения после заражения составляло около 21% от исходных значений. На 10 сутки наблюдения у 6 выживших мышей уже наблюдалось увеличение массы тела с 15,9±1,9г до17,2±2,2г, хотя и не достигающее исходных значений.

Полученные результаты позволяют заключить, что профилактическое введение экспериментальным животным сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в дозе 200мг/кг массы привело к снижению смертности на 60% и облегчению клинических симптомов течения стафилококковой инфекции у мышей, что и явилось обоснованием для продолжения исследования терапевтической активности изучаемого фитоэкстракта.

Оценка противовоспалительной активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim при стафилококковой генерализованной инфекции у мышей.

Инфекции, вызванные стафилококком у людей, часто сопровождаются острой системной воспалительной реакцией с высокой летальностью [276]. Одной из удобных и хорошо изученных экспериментальных моделей патологических состояний является бактериемия у мышей, вызванная внутривенным введением вирулентного штамма *S. aureus*.

При использовании этой модельной патологии у экспериментальных животных наблюдается широкий спектр реакций и клинических признаков. Определенный прогностический интерес представляют лейкоцитоз или лейкопения, а также выработка провоспалительных цитокинов – ФНО-α, ИЛ-6, С-реактивный белок [277].

Сильнейшая воспалительная реакция и «цитокиновый шторм» играют ведущую роль в патогенезе септических инфекций. По литературным данным, у лабораторных животных основными показателями клинического проявления сепсиса являются: снижение активности и аппетита, и, как следствие, массы тела, изменение лейкоцитарной формулы, наличие

септических очагов в паренхиматозных органах и наличие возбудителя в крови (септикопиемия).

Для получения септической модели в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых БАВ рекомендован к применению вирулентный штамм золотистого стафилококка, выделенный от больных [233].

Перед началом основного эксперимента предварительно была установлена заражающая доза *S. aureus* в концентрации 12×10^9 КОЕ/мл, которая вызывала гибель 90 % мышей к 7 суткам с момента заражения.

В серии экспериментов по изучению влияния фитоэкстракта на течение стафилококковой инфекции при применении его по лечебной схеме были использованы 40 аутбредных белых мышей.

Заражение животных производили однократным введением мышам в хвостовую вену 0,2 мл взвеси золотистого стафилококка в 0,9 % стерильном растворе хлористого натрия.

Рис. 6.1.3. Заражение животных взвесью *S. aureus*

Эффективность воспроизведения инфекционного процесса у экспериментальных животных была подтверждена наличием клинических симптомов и достоверным снижением массы тела мышей в 1,2 раза через 3 суток после заражения. На 4 сутки после развития генерализованной стафилококковой инфекции мышам было начато введение раствора сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в дозах 20 мг/кг и 200 мг/мг в течение 7 дней.

Контролем служили зараженные, но нелеченые животные. Заражённые и нелеченые животные стали погибать уже на 3 сутки эксперимента. К 7 дню наблюдения все животные в этой группе погибли. При этом в группах животных, получавших изучаемых фитоэкстракт, смертность снизилась, а продолжительность жизни увеличилась. Так, в группе животных, получавших фитоэкстракт в дозе 20 мг/кг, к 7 дню эксперимента смертность достигла 40%. У мышей получавших раствор сухого экстракта Padus Grayanae Maxim по лечебной схеме в дозе 200 мг/кг массы уровень выживаемости мышей к 7 дню эксперимента составил уже 80 % (рис. 6.1.4).

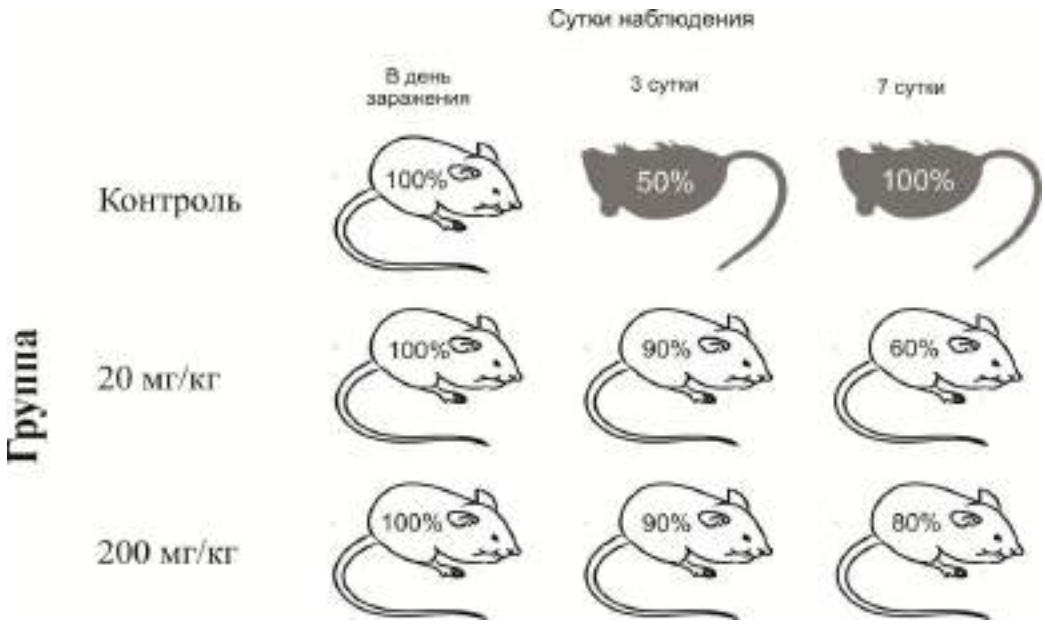


Рис. 6.1.4. Выживаемость мышей при стафилококковой инфекции при введении сухого экстракта Padus Grayanae Maxim по лечебной схеме (n=10)

Одним из БАВ изучаемого фитоэкстракта является хлорогеновая кислота. В литературе имеются данные, что хлорогеновая кислота увеличивает выживаемость мышей при стафилококковой инфекции, но при этом обсемененность внутренних органов сохраняется [278].

После заражения мышей масса их тела стала стремительно снижаться. Ухудшался аппетит, животные отказывались от корма и воды. Масса тела мышей к 3 дню во всех группах зараженных животных была достоверно ниже, чем у контрольных животных.

К 7 дню терапии изучаемым фитоэкстрактом, у мышей, получавших изучаемое вещество в дозе 20 мг/кг масса тела увеличилась на 18,8%, а в группе животных, получавших сухой экстракта Padus Grayanae Maxim в дозе 200 мг/кг наблюдалось достоверное увеличение массы тела.

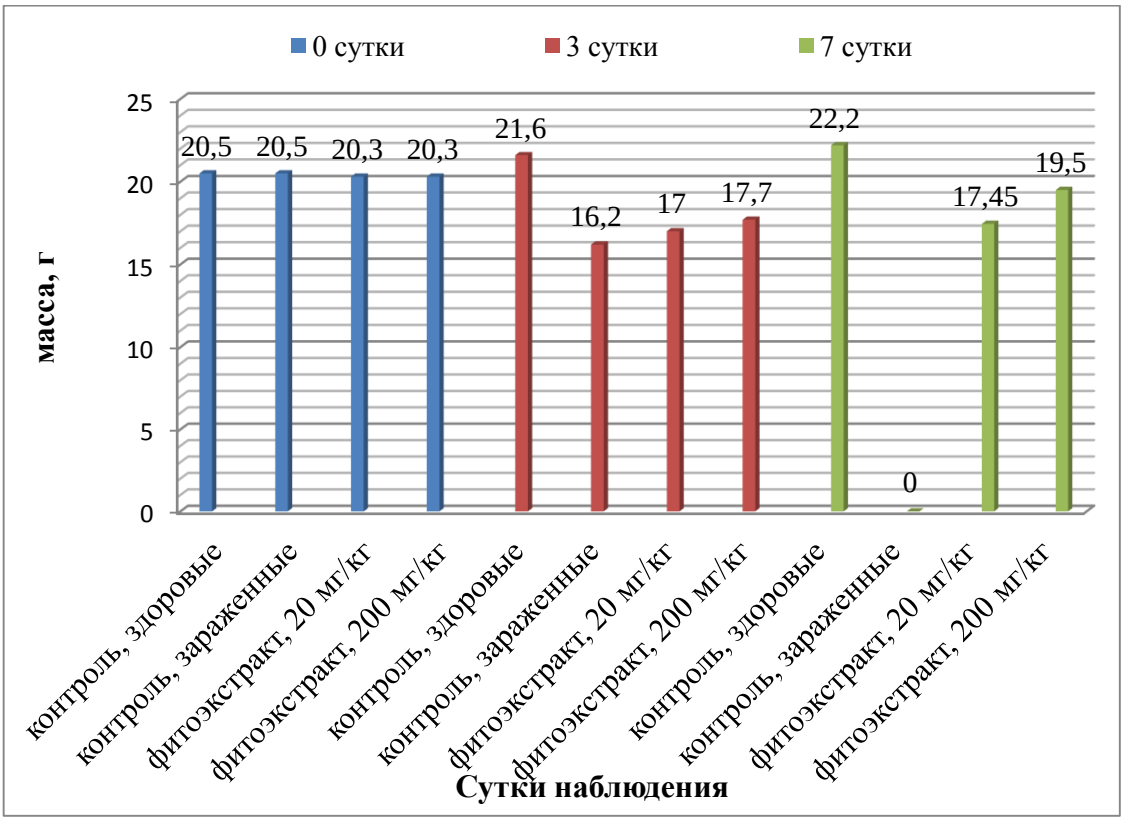


Рис. 6.1.5. Динамика массы тела мышей со стафилококковой инфекцией при введении сухого экстракта Padus Grayanae Maxim по лечебной схеме (n=10)

Следовательно, изучение динамики массы тела мышей выявило прямую зависимость массы тела от применяющейся дозы сухого экстракта Padus Grayanae Maxim.

Гематологические изменения при септических инфекциях имеют большое прогностическое значение. Лейкоцитоз (более $12x10^9$/л) или лейкопения (менее $4x10^9$/л) с нейтрофилезом являются одним из критериев синдрома системной воспалительной реакции организма (systemic inflammatory response syndrome, SIRS).

В таблицах 6.1.3 и 6.1.4 представлены результаты изучения гематологических показателей у самок и самцов мышей с моделированной стафилококковой инфекцией в сравнении со контрольными животными.

После введения зараженным животным сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в дозе 20 мг/кг у самок наблюдался моноцитоз и тромбоцитопения.

Однако другие показатели не имели существенных отличий от показателей животных контрольной группы.

Таблица 6.1.3 – Гематологические показатели мышей - самок с воспроизведенной стафилококковой инфекцией после введения раствора сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в течение 7 суток

Показатель	**Контрольная группа (n=10)**	**Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim, 20 мг/кг(n=10)**	**Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim, 200 мг/кг(n=10)**
Эритроциты	10,2±1,3	8,4±0,1	10,5±1,3
Лейкоциты	4,5±1,4	8,45±1,8	5,5±0,8
Лимфоциты	3,7±1,5	5,5±0,4	4,6±0,6
Гранулоциты	2,2±0,6	1,45±0,40	1,6±0,5
Моноциты	1,05±0,40	2,6±0,1**	1,0±0,4
Тромбоциты	1041,0±59,0	552,5±137,9*	965,5±138,0

Примечание:
* $p<0,05$, ** $p < 0,01$

Таблица 6.1.4 – Гематологические показатели мышей - самцов с воспроизведенной стафилококковой инфекцией после введения раствора сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в течение 7 суток

Показатель	Здоровые (n=10)	Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim, 20 мг/кг (n=10)	Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim, 200 мг/кг (n=10)
Эритроциты	10,58±1,0	9,05±1,6	10,4±1,7
Лейкоциты	4,52±1,3	12,2±0,4**	4,9±1,2
Лимфоциты	2,82±1,0	5,3±0,8	5,0±1,6
Гранулоциты	2,86±0,6	1,85±0,60	1,9±0,7
Моноциты	1,18±0,4	2,45±0,4	1,4±0,3
Тромбоциты	1005,4±110,0	654,0±185,3	892,3±117,8

Примечание: ** $p<0,01$

Напротив, у самцов было отмечено достоверное увеличение количества лейкоцитов ($p<0,01$), но без сдвига лейкоцитарной формы влево или вправо. Это говорит о том, что период острой фазы развития инфекционного процесса прошел, и наблюдается формирование защитной реакции организма, направленной на нейтрализацию микроба, а также восстановление гомеостаза.

У зараженных животных, получавших в течение 7 суток сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в дозе 200 мг/кг по лечебной схеме, все гематологические показатели приходили к значениям, не отличающимся от показателей животных контрольной группы.

Нормализация количества лейкоцитов и восстановление уровня тромбоцитов у зараженных животных, получавших изучаемый фитоэкстракт в дозе 200 мг/кг, является важнейшим позитивным признаком при синдроме системной воспалительной реакции, когда наблюдается дисфункция многих органов и систем организма [279].

Полученные результаты согласуются с имеющимся литературными данными, согласно которым многие полифенольные соединения, содержащиеся в фитоэкстрактах, обладают выраженной противовоспалительной и иммуностимулирующей активностью. Они подавляют секрецию провоспалительных цитокинов IL-1, TNF-α и усиливают фагоцитоз [280, 281].

Некропсия животных, проведенная на 8 сутки течения эксперимента, показала сохранение очагов инфекционного процесса в легких и почках во всех группах зараженных животных. При этом наименее выраженными эти очаги были у животных, получавших изучаемый фитоэкстракт в дозе 200 мг/кг.

Таким образом, сухой экстракт Padus Grayanae Maxim дозозависимо подавляет гипервоспалительную реакцию при септической стафилококковой инфекции у экспериментальных животных.

При введении его по лечебной схеме увеличивает выживаемость мышей до 80 % и нормализует показатели периферической крови.

На экспериментальной септической модели у мышей, индуцированной клиническим изолятом *Staphylococcus aureus,* установлено, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim обладает иммуномодулирующим действием.

6.2. Изучение противовоспалительной активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim in vitro

БАВ, присутствующие в сухом экстракте Padus Grayanae Maxim, такие как кофейная и хлорогеновая кислота, рассматриваются и как потенциальные противовоспалительные вещества [282]. Так, известно, что эфир кофейной кислоты блокирует сигнальный путь NF-kB и транскрипционный фактор AP-1 при стимуляции клеток AGS *Helicobacter pylori* [283], а фенилэтиловый эфир кофейной кислоты ингибирует гены индуцибельной

нитрооксидсинтетазы (iNOS), активированные интерфероном-гамма (ИФН-γ) и липополисахаридом (LPS) *in vitro* [284].

Установлено также, что ИФН-γ является одним из ведущих провоспалительных цитокинов и играет ведущую роль в патогенезе многих заболеваний, хотя сам по себе он не влияет на тяжесть протекающей инфекции или смертность [285, 286].

ИФН-γ ингибирует дифференциацию Th2-клеток, которые продуцируют IL-4, -5, -10 и -13 и стимулируют преимущественно гуморальное звено иммунитета. Напротив, IL-4 способствует дифференцировке Th2-клеток и ингибирует дифференцировку Th1-клеток, продуцирующих ИФН-γ [287].

Согласно современным представлениям считается, что поляризация иммунного ответа в сторону активации Th1-клеток приводит к нарушению баланса провоспалительной/противовоспалительной реакции иммунитета [288].

В связи с вышеизложенным на следующем этапе исследований нами изучалось влияние сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на способность индуцировать ИФН-γ и противовоспалительного цитокина IL-4 мононуклеарными клетками человека (МНК).

В таблице 6.2.1. представлены результаты определения продукции цитокинов в супернатантах МНК крови *in vitro*, как без стимуляции, так и со стимуляцией, что обеспечивает надежную оценку способности клеток продуцировать цитокины.

Для этого был использован универсальный Т-клеточный индуктор конканавалин А (КонА) в концентрации 5 мкг/мл.

Результаты исследований показали, что под воздействием сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на МНК *in vitro* не наблюдается увеличения продукции ни IL-4, ни ИФН-γ (табл. 6.2.1).

Таблица 6.2.1 – Продукция цитокинов под воздействием сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в течение 24 часов in vitro

Концентрация сухого экстракта Padus Grayanae Maxim, мг/мл	Концентрация цитокинов, пг/мл			
	ИФН-γ		IL-4	
	КонА «-»	КонА «+»	КонА «-»	КонА «+»
Контроль	9,4±2,5	7,4±5,4	2,8±0,8	5,7±0,8
0,625	7,8±1,6	8,7±2,9	3,6±1,2	6,0±1,2
0,312	13,1±2,6	14,1±1,9	4,3±2,9	6,3±1,5
0,156	10,3±0,8	9,5±0,8	5,1±2,5	4,5±1,7
0,078	-	10,1±2,1	4,5±2,5	5,9±1,5

Это согласуется с имеющимися в литературе данными, что некоторые флавоноиды, например, кверцетин, подавляют продукцию IL-4 [289].

Таким образом, можно утверждать, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim не влияет на баланс провоспалительного/противоспалительного иммунитета. Отсутствие индукции IL-4 является хорошим прогностическим признаком, так как IL-4 активирует не только В-клетки, но и повышает уровень продукции IgE. Кроме того, он обладает антиапоптотическим свойством и является фактором выживания опухолевых клеток.

Хотя плейотропный эффект IL-4 не позволяет однозначно трактовать полученные результаты в сторону ингибирования продукции IL-4 [290].

Следует принять во внимание, что противовоспалительный эффект флавоноидов может также достигаться за счёт ингибирования продукции МНК провоспалительных цитокинов, таких как IL-1β, IL-8, TNF-α [291, 292].

Известно, что IL-1β является индуцибельным цитокином и в нестимулированных нейтрофилах ни mRNA IL-1β, ни внутриклеточный белок IL-1β не определяются. При этом основными индукторами синтеза IL-1β являются компоненты клеточных стенок бактерий, в частности, LPS.

В таблице 6.2.2. показаны результаты изучения влияния сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на индукцию IL-1β МНК.

Таблица 6.2.2. – Влияние сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на индукцию IL-1β МНК в течение 24 часов in vitro

Концентрация сухого экстракта Padus Grayanae Maxim, мг/мл	**Концентрация IL-1β, пг/мл**
Контроль (вода)	80,5±25,1
Контроль (только LPS – 0,005)	952,5±70,3
0,625	640,8±68,8
0,312	561,3±42,1*
0,156	515,0±34,3*
0,078	421,2±85,2*
0,039	489,5±68,7*

Примечание: *p<0,05 против контроля

Как видно из данных таблицы 6.2.2, сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в концентрациях от 0,312мг/мл до 0,039 мг/мл статистически значимо (p<0,05) ингибирует продукцию симулированными МНК ключевого провоспалительного цитокина – IL-1β.

Как и IL-1, TNF-α играет ведущую роль в иммунном ответе и патогенезе заболеваний различной этиологии, включая аутоиммунные процессы [293, 294]. Эти оба цитокина индуцируют продукцию адгезивных молекул эндотелия сосудистой стенки. В результате запускается каскад реакций, приводящих к изменению проницаемости микрососудов, продукции других цитокинов, транспорта веществ, высвобождается внутриклеточный кальций и повышается активность НАДН-оксидазы, что приводит к окислительному «взрыву». В результате между IL-1 и TNF-α проявляется синергетический эффект [295].

В экспериментальных моделях по изучению роли TNF-α в повреждающей активности клеток печени используют лектин КонА, который стимулирует пролиферацию макрофагов, Т- и В-лимфоцитов [296].

В следующей серии опытов для стимуляции продукции TNF-α использовался LPS. Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim добавляли в различных концентрациях к активированным МНК человека, инкубировали с LPS в течение 24 и 48 часов и иммуноферментным анализом (ИФА) определяли содержание TNF-α в супернатанте (рис. 6.2.1).

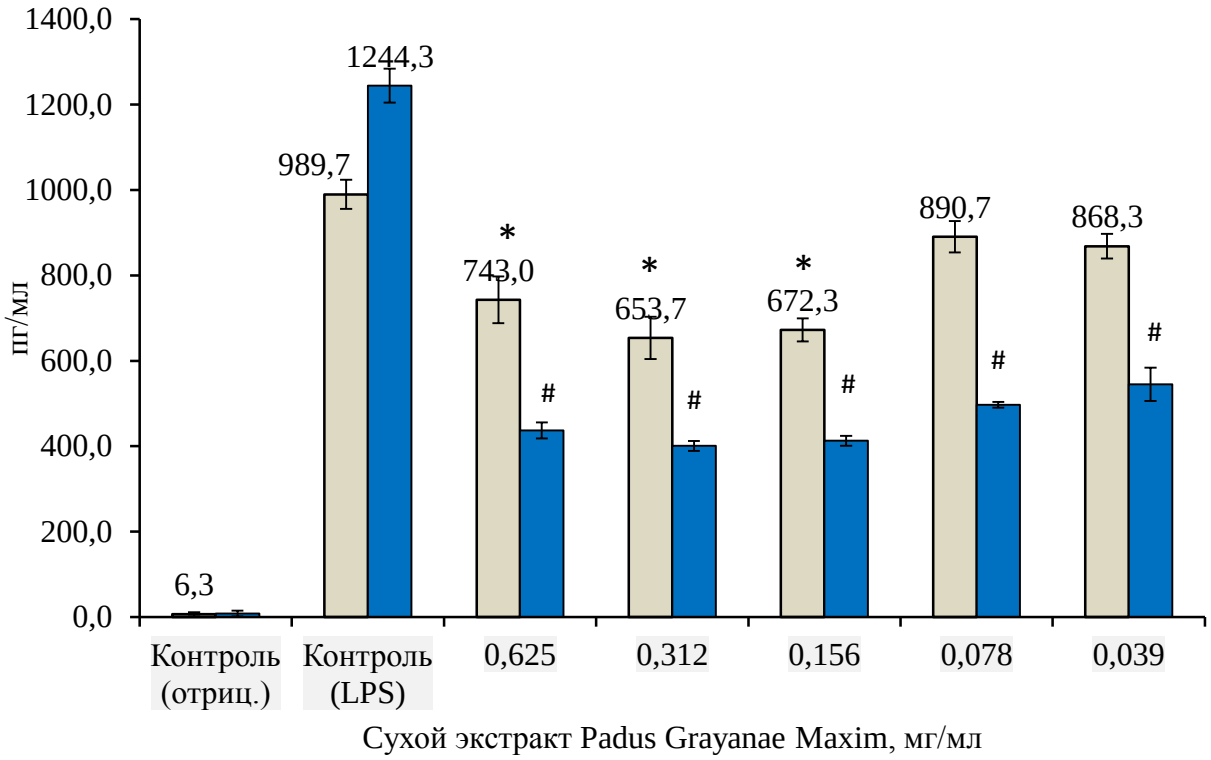


Рис. 6.2.1. – Ингибирование продукции TNF-α под воздействием сухого экстракта Padus Grayanae Maxim **в течение 24 и 48 часов**

Примечание:
* p<0,05 против контроля с LPS – 24 ч,
# p<0,05 против контроля с LPS – 48 ч

В этой серии экспериментов было выявлено, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim ингибирует индукцию TNF-α под действием LPS на МНК в

концентрациях от 625 мг/мл до 0,156 мг/мл при воздействии в течение 24 часов ($p<0,05$).

Кроме того, установлено, что увеличение времени обработки изучаемым фитоэкстрактом МНК до 48 часов, приводит к росту его ингибирующей активности ($p<0,05$).

Согласно литературным данным, природные полифенолы, антоцианы и флавоноиды обладают различной активностью в отношении TNF-α – некоторые ингибируют, а некоторые стимулируют продукцию этого цитокина [297].

Одним из важнейших компонентов полифенольной фракции фитоэкстрактов является хлорогеновая кислота, которая дозозависимо снижает продукцию IL-1β и TNF-α в модели макрофагов мышей при стимуляции LPS [298].

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований в условиях *in vitro*, удалось установить отсутствие активации ИФН-γ и подавление продукции IL-1β и TNF-α стимулированных МНК липополисахаридом грамотрицательных бактерий, как основных факторов воспалительного процесса, что прямо указывает на противовоспалительную активность сухого экстракт Padus Grayanae Maxim.

БАВ, входящие в состав изучаемого фитоэкстракта – кофейная и хлорогеновая кислоты и полифенолы, проявляют синергетический эффект.

6.3. Изучение противоопухолевой активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim in vitro

Изучение цитотоксичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim проводили на культуре MDCK (эпителиальные клетки почки собаки), а также на следующих опухолевых клеточных линиях: HeLa (цервикальная аденокарцинома человека), AGS (аденокарцинома желудка), RD

(рабдомиосаркома мышей), HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома человека) и MiaPaCa2 (панкреатическая карцинома человека).

Все культуры опухолевых клеток были получены из Американской коллекции типированных культур (ATCC). Условия культивирования соответствовали рекомендациям ATCC для каждой культуры отдельно. Перед началом эксперимента каждую культуру проверяли на жизнеспособность трипановым синим. Во всех экспериментах использовали суспензию опухолевых клеток с процентом жизнеспособности более 90 %.

Для получения рабочего раствора изучаемый фитоэкстракт растворяли в минимальном объеме этанола из расчёта 10 мг на 0,2 мл 96% этанола. После чего полученный раствор разбавляли стерильной апирогенной водой до 0,5 мл. Рабочий раствор сухого экстракта Padus Grayanae Maxim разбавляли средой RPMI в объеме 1 к 1 и вносили в лунки со средой для культивирования и опухолевыми клетками. Инкубацию проводили в течение 24 часов. В качестве препарата сравнения использовали Доксорубицин гидрохлорид (D1515, Sigma, США).

Смертность клеток оценивали MTT-тестом по образованию нерастворимого формазана. Измерение оптической плотности растворенного формазана в 100 мкл DMSO, производили на микропланшетном ридере Sunrise RC.4 при длине волны 540 нм. Опыты проводили в трёх повторах. Результаты обрабатывались статистическими методами. Построение кривых зависимости «доза – эффект» и расчёт средней цитотоксической концентрации ($ЦТК_{50}$) проводили методом нелинейной регрессии по уравнению Хилла (формула 6.1.):

Формула 6.1.

$$y = B + \frac{(A-B)}{1+10^{(logEC50-x)\times\sigma}}$$

где:
A – значение выше 50 % эффекта,
B – значение ниже 50 % эффекта,
$LogEC_{50}$ – значение X, когда эффект составляет ½ отрезка между A и B,
σ – угол наклона кривой.

Достоверность результатов между клеточными линиями проверяли по Краскелу-Уоллису, с множественным сравнением тестом Данна.

Доксорубицин в наших исследованиях выступал в качестве позитивного контрольного препарата. Однако сравнивать противоопухолевую активность изучаемого фитоэкстракта с ним было бы не вполне корректно, так как эти вещества имеют различную химическую природу, и, по всей видимости, различные механизмы действия. Важно отметить, что все линии опухолевых клеток проявили схожую однонаправленную чувствительность к обеим веществам.

Средние цитотоксические концентрации для сухого экстракта Padus Grayanae Maxim и позитивного контрольного препарата - доксорубицина представлены в таблице 6.3.1.

Таблица 6.3.1 – ЦТК$_{50}$ для сухого экстракта Padus Grayanae Maxim и доксорубицина для культур различных опухолевых клеток

Клеточная линия	Сухой экстракт Padus Grayanae Maxim (мг/мл)	Доксорубицин (мг/мл)
MDCK	2,20±0,08	0,103±0,012
HeLa	0,55±0,10	0,006±0,001
AGS	0,65±0,06	0,0004±0,0001
RD	0,50±0,10	0,0048±0,0015
HepG2	2,06±0,10*	0,006±0,002
MiaPaCa2	0,51±0,07	0,0028±0,0011

Примечание: *p<0,05 против клеток AGS

Как видно из таблицы 6.3.1, сухой экстракт Padus Grayanae Maxim специфически и эффективно подавляет пролиферацию опухолевых клеток цервикальной аденокарциномы человека, аденокарциномы желудка, панкреатической карциномы человека и рабдомиосаркомы мышей в концентрациях 0,50 – 0,65 мг/мл, что статистически достоверно ниже, чем ЦТК$_{50}$ для нормальных клеток MDCK в 3,4 раза.

По результатам расчета и сравнения $ЦТК_{50}$ между различными клеточными линиями, использованными в эксперименте, чувствительность нормальных и опухолевых клеток к изучаемому фитоэкстракту и контрольному препарату доксорубицину была не всегда одинакова.

Кроме того, из табличных данных следует, что $ЦТК_{50}$ сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на клетках AGS и HepG2 достоверно отличались, с $p = 0,03$. По другим клеточным линиям достоверности для значения $ЦТК_{50}$ не обнаружено.

На рисунках 6.3.1. – 6.3.5 представлено влияние экстракта на каждую клеточную линию опухолевых клеток и проиллюстрировано в виде кривых «доза – эффект».

Установлено, что профили всех полученных кривых имели схожие формы. Наиболее часто в качестве тестовой системы для исследования противоопухолевой активности разрабатываемых лекарственных препаратов используют клетки цервикальной аденокарциномы человека (HeLa).

В наших исследованиях культура цервикальной аденокарциномы человека имела достаточно высокую чувствительность к сухому экстракту Padus Grayanae Maxim сравнении с клетками MDCK (рис. 6.3.1).

Рис. 6.3.1 – Цитотоксичность сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в отношении клеток MDCK и HeLa

$ЦТК_{50}$ для сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на клетках HeLa составила 0,55 мг/мл, тогда как для MDCK этот показатель был 2,20 мг/мл, что примерно в четыре раза выше (табл. 6.3.1).

Изучение дозозависимого воздействия сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на линию опухолевых клеток аденокарциномы желудка (AGS) в сравнении с нормальными эпителиальными клетками почки собак показало (рис. 6.3.2), что опухолевые клетки AGS более чувствительны к изучаемому фитоэкстракту, чем нормальные клетки MDCK.

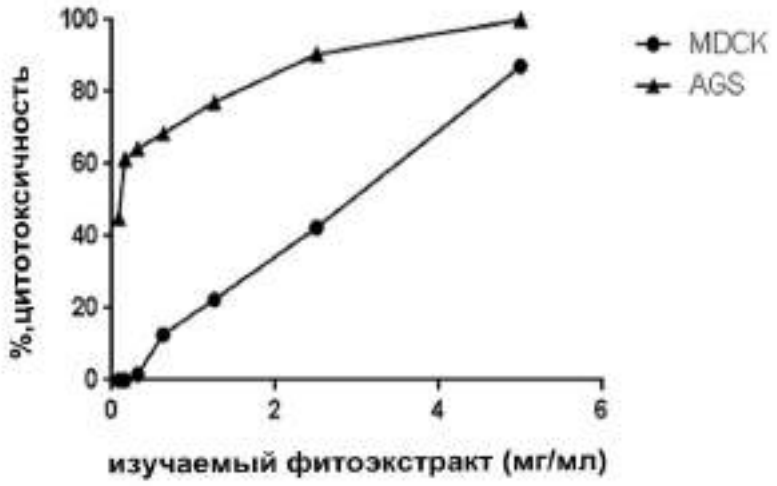


Рис.6.3.2 – Цитотоксичность сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в отношении клеток MDCK и AGS

Цитотоксичность исследуемого фитоэкстракта на культуре MDCK начинала проявляться с 0,625 мг/мл, тогда как для культуры опухолевых клеток линии AGS с - 0,078 мг/мл. Данные по $ЦТК_{50}$ для сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на обеих линиях представлены в таблице 6.3.1.

Исследование цитотоксичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на клетках рабдомиосаркомы мышей (RD) выявило резкое увеличение его эффективности в диапазоне концентраций 0,313 – 0,625 мг/мл с $ЦТК_{50}$ около 0,5 мг/мл по сравнению с нормальными клетками MDCK (рис. 6.3.3).

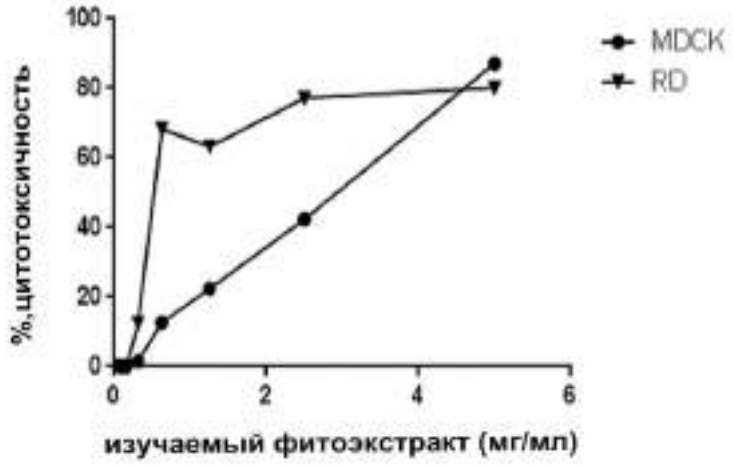


Рис.6.3.3 – Цитотоксичность сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в отношении клеток MDCK и RD

Интересными оказались результаты цитотоксического действия изучаемого фитоэкстракта на один из самых злокачественных и плохо поддающихся терапии онкологических заболеваний - рак поджелудочной железы. Клетки панкреатической карциномы человека также проявили чувствительность к сухому экстракту Padus Grayanae Maxim (рис. 6.3.4). $ЦТК_{50}$ для этой линии клеток составила 0,51 мг/мл (таблица 6.3.1).

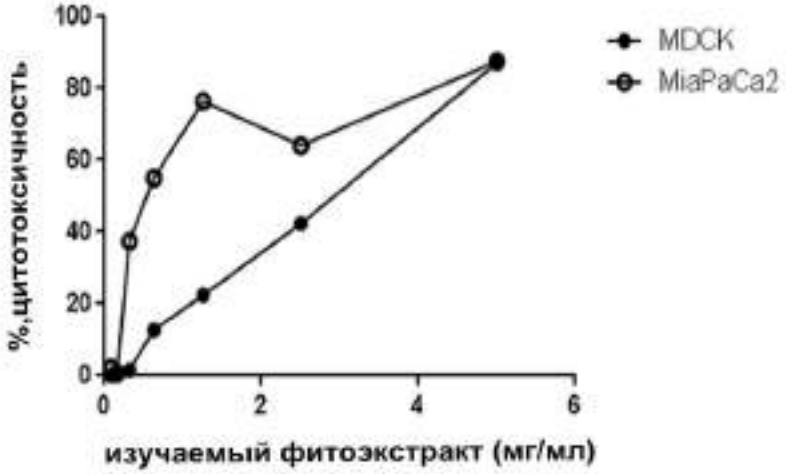


Рис.6.3.4 – Цитотоксичность сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в отношении клеток MDCK и MiaPaCa2

Профиль кривой «доза – эффект» на линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека практически не отличался от MDCK (рис. 6.3.5).

Рис.6.3.5 – Цитотоксичность сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в отношении клеток MDCK и HepG2

Полученные результаты указывают на то, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim практически не проявил противоопухолевой активности вплоть до концентрации 1,2 мг/мл, что можно трактовать как устойчивость линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека к воздействию изучаемого фитоэкстракта.

Таким образом, изучение противоопухолевой активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim в условиях in vitro показало, что изучаемый фитоэкстракт обладает противоопухолевым действием в отношении линий опухолевых клеток цервикальной аденокарциномы человека, аденокарциномы желудка, панкреатической карциномы человека и рабдомиосаркомы мышей.

Достаточно высокая специфичность действия изучаемого фитоэкстракта выявлена в отношении линии опухолевых клеток аденокарциномы желудка человека (AGS).

Клеточная линия опухолевых клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) проявила резистентность к сухому экстракту Padus Grayanae Maxim, и $ЦТК_{50}$ в этом случае были сравнимы с концентрациями для нормальной клеточной линии MDCK.

В состав сухого экстракта Padus Grayanae Maxim входят флавоноиды, хлорогеновая и кофейная кислоты, которые обладают широким диапазоном цитотоксичности, что может обусловить их специфическое действие в отношении различных опухолевых штаммов. Так, в работе Dong Y. и соавторов [299] показана высокая активность флавоноидов против клеточной линии опухолевых клеток аденокарциномы желудка человека (AGS).

В литературе также имеются данные, что хлорогеновая и кофейная кислоты, входящие в состав сухого экстракта Padus Grayanae Maxim, проявляют антираковый эффект в отношении клеток лейкемии HL-60, незначительно ингибируют рост клеток AGS и практически не действуют HepG2 [300].

6.4. Изучение антиоксидантной активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim in vitro

Антиоксидантную активность Padus Grayanae Maxim определяли по значению величины IC50 (концентрация экстракта, при которой PI=50%, при данной начальной концентрации радикала DPPH и фиксированном соотношении объемов разведенных растворов).

Навеска испытуемого образца сухого экстракта Padus Grayanae Maxim 0,5 грамм + 50 мл (70^0 этанола) помещалась в водяную баню на 30 минут. После фильтрации экстракта этанолом его доводили объем до 50 мл. В качестве препарата сравнения использовали разрешенное к медицинскому применению ЛС растительного происхождения из группы иммуностимуляторов - Иммунал, 1 мл которого содержит 0,8 мл сока,

полученного из свежесобранной травы эхинацеи пурпурной. К 0,5 мл фитопрепарата Echinaceae purpurea добавили 4,5 мл 70% этанола для получения исходного раствора. Далее тестируемые образцы разбавляли в соотношении 1:10, 1:20,1:40, 1:60, 1:80, 1:100 для определения значения величины IC50. После смешивания экстрактов с DPPH образцы переносили в темноту на 30 минут и снимали показания на спектрофотометре при длине волны 517 нм. Статистическую обработку данных проводили с использованием Microsoft Excel в версии 2013г. по формуле 6.2:

Формула 6.2.

Антиоксидантная активность = $[(A_0-A_1)/A_0] \times 100$ %

где:
A_o – величина антиоксидантного поглощение DPPH раствора (контроль);
A_1 – антиоксидантная активность исследуемого раствора с DPPH реактивом.

Антирадикальные свойства растительного экстракта рассчитывались по значению IC50 DPPH (мкг/мл) - концентрации антиоксидантов, которые ингибируют свободные радикалы DPPH на 50%.

Исследования антиоксидантной активности растительного экстракта Padus Grayanae Maxim (табл. 6.4.1) в сравнении с ЛП Иммунал (табл. 6.4.2) проводились в трехкратной повторности.

Таблица 6.4.1 - Результаты оценки антиоксидантной активности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Разбавление	**Антиоксидантная активность изучаемого фитоэкстракта, %**	**IC50 ^{DPPH} мкг/мл**
I повторность		
Исходный	27.64	45,4
1:10	13.57	
1:20	12.41	
1:40	19.53	
1:60	67.54	
1:80	99.83	
1:100	101.98	

II повторность		
Исходный	24.11	51,7
1:10	11.39	
1:20	12.42	
1:40	14.34	
1:60	51.92	
1:80	91.27	
1:100	97.04	
III повторность		
Исходный	21.04	56,7
1:10	13.94	
1:20	10.7	
1:40	11.58	
1:60	52.42	
1:80	77.08	
1:100	91.4	
Среднее		51,2

Процент падения радикалов DPPH в зависимости от концентрации сухого экстракта Padus Grayanae Maxim показан на рисунке 6.4.1.

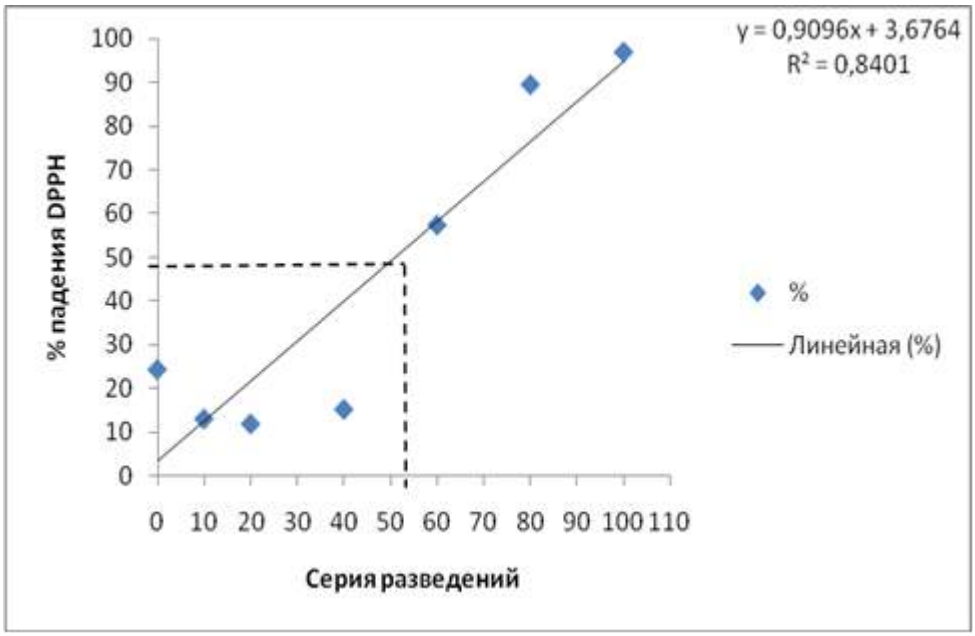


Рис. 6.4.1. Среднее значение IC50 ^{DPPH} для сухого экстракта Padus Grayne Maxim

Полученные данные позволили установить, что средняя антиоксидантная активность сухого экстракта Padus Grayne Maxim равна IC50 DPPH = 51,2 мкг/мл.

Таблица 6.4.2 - Результаты оценки антиоксидантной активности фитопрепарата Иммунал

Разбавление	**Антиоксидантная активность в растительном экстракте, %**	**IC50 ^{DPPH} мкг/мл**
I повторность		
1:10	30.45	IC50 = 55
1:20	21.50	
1:40	18.84	
1:60	46.65	
1:80	78.09	
1:100	87.22	
II повторность		
1:10	33.11	IC50 = 55
1:20	21.71	
1:40	19.29	
1:60	41.88	
1:80	81.80	
1:100	91.23	
III повторность		
1:10	32.09	IC50 = 47
1:20	22.20	
1:40	16.70	
1:60	50.34	
1:80	94.28	
1:100	118.53	
Среднее		IC50 = 52,33

Процент падения радикалов DPPH в зависимости от концентрации изучаемого препарата Имунал представлен на рисунке 6.4.2.

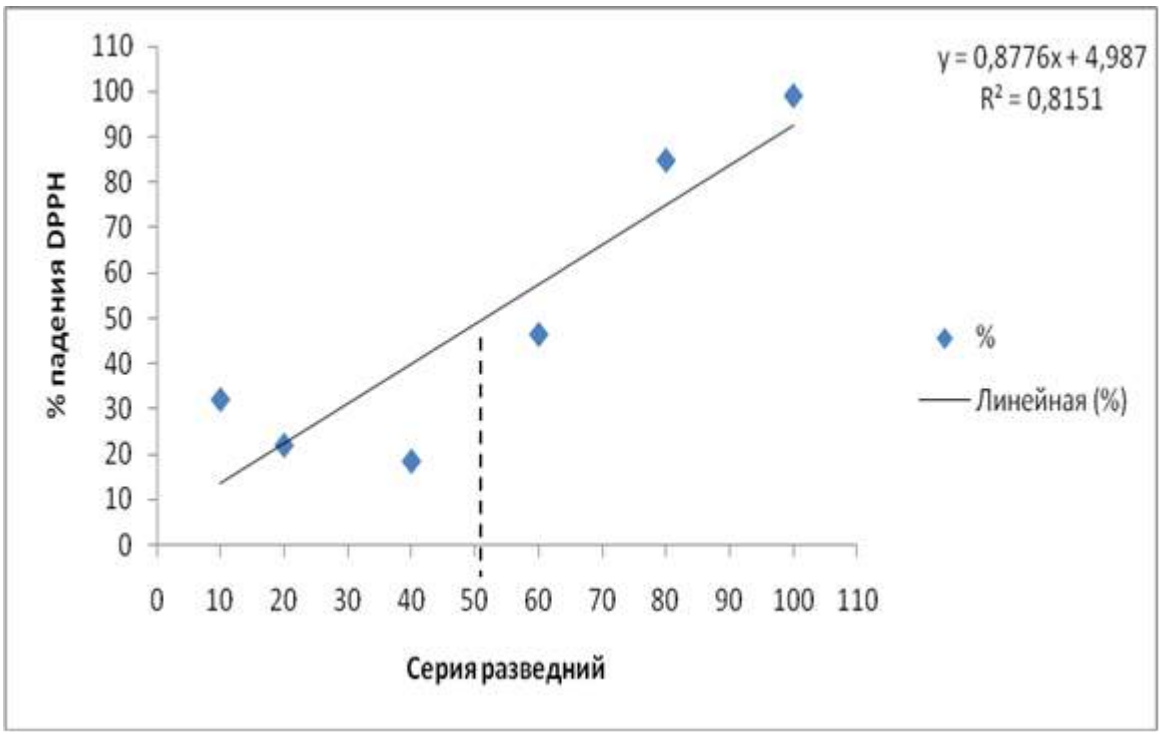


Рис. 6.4.2. Среднее значение IC50 ^{DPPH} для фитопрепарата Иммунал

Как видно из представленных данных, средняя антиоксидантная активность растительного иммуностимулятора Иммунал равна IC50 DPPH = 52,33 мкг/мл.

Таким образом, результаты экспериментов в условиях in vitro с использованием метода DPPH показали, что средние значения IC50 ^{DPPH} фитопрепарата Эхинацеи пурпурной (Иммунал) и сухого экстракта Padus Grayanae Maxim сопоставимы и существенных отличий не имеют. Оба изучаемых фитоэкстракта обладают умеренно выраженными антиоксидантными свойствами [301].

Заключение по 6 главе.

Результаты доклинических исследований, представленные в 6 главе, показали, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim обладает противовоспалительным, иммуномодулирующим, противоопухолевым и антиоксидантным действиями.

Установлено, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim дозозависимо подавляет гипервоспалительную реакцию при септической стафилококковой

инфекции у экспериментальных животных, увеличивает выживаемость мышей до 80 % и нормализует показатели периферической крови. На экспериментальной септической модели у мышей, индуцированной клиническим изолятом *Staphylococcus aureus*, установлено, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim обладает иммуномодулирующим действием.

В исследованиях *in vitro* выявлено отсутствие активации ИФН-γ и подавление продукции IL-1β и TNF-α стимулированных МНК липополисахаридом грамотрицательных бактерий, что прямо указывает на противовоспалительную активность сухого экстракт Padus Grayanae Maxim.

Показано, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в условиях in vitro обладает противоопухолевым действием в отношении линий опухолевых клеток аденокарциномы желудка человека, цервикальной аденокарциномы человека, панкреатической карциномы человека и рабдомиосаркомы мышей.

В условиях in vitro установлено, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim обладает умеренно выраженными антиоксидантными свойствами, сопоставимыми с фитопрепаратом Эхинацеи пурпурной (Иммунал).

ГЛАВА 7
РАЗРАБОТКА ТВЕРДЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ СУХОГО ЭКСТРАКТА PADUS GRAYANAE MAXIM И ИХ СТАНДАРТИЗАЦИЯ

7.1. Технологическая разработка и стандартизация таблеток из сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

При создании новых препаратов из растительного сырья, большое значение имеет их готовая лекарственная форма, которая должна обеспечивать точность дозирования действующего вещества в условиях массового производства, эффективность, безопасность, удобство применения, устойчивость при транспортировке и хранении.

Кроме того, использование твердых лекарственных форм обеспечивает более высокую приверженность лечению со стороны пациентов, так как применять лекарство в таблетках гораздо проще, чем делать отвары лекарственных растений или использовать спиртовую настойку. Имеет значение и удобство применения в местах (вне дома), где нет возможности налить капли в стакан, сделать настой и т.д.

Поэтому твердые лекарственные формы лекарственных препаратов, изготовленные на основе сухих растительных экстрактов, вполне отвечают данным критериям.

Для получения твердой лекарственной формы с сухим экстрактом из надземных частей Padus Graynae Maxim использована технология получения таблеток методом прямого прессования с использованием вспомогательных веществ, специально разработанных для прямого прессования.

Ингредиенты:

1. *Padus Graynae Maxim экстракт сухой* - сыпучий порошок светло-желтого, желтого или светло-коричневого цвета со слабым специфическим запахом.

2. *Super Tab 30 GR* – гранулированный лактозы моногидрат, наполнитель. Соответствует требованиям Фармакопеи США – Национального Формуляра, Европейской фармакопеи и Японской фармакопеи. Производитель - DMV-Fonterra Excipients GmbH & Co.KG, Nörten Hardenberg, Германия.

3. *Pharmacel 102* – микрокристаллическая целлюлоза, наполнитель. Соответствует требованиям Фармакопеи США – Национального Формуляра, Европейской фармакопеи и Японской фармакопеи. Производитель - DMV-Fonterra Excipients GmbH & Co.KG, Nörten Hardenberg, Германия.

4. *Aerosil 200* – кремния диоксид коллоидный, гидрофильный высокодисперсный, (50-60 г/л), глидант. Соответствует требованиям Фармакопеи США – Национального Формуляра и Европейской фармакопеи. Производитель - Evonik Degussa GmbH, Германия.

5. *Магния стеарат,* смазывающее. Соответствует требованиям Европейской фармакопеи. Производитель – Vega Pharma Limited, КНР.

Таблица 7.1.1. - Состав одной таблетки

№	Ингредиенты	Масса (мг)
1	Padus Graynae Maxim экстракт сухой	30,0
2	Лактоза (Super Tab 30GR)	184,7
3	Микрокристаллическая целлюлоза (Pharmacel 102)	80,0
4	Кремния диоксид коллоидный (Aerosil 200)	2,3
5	Магния стеарат	3,0
Средний вес таблетки		**300,0**

Технологический процесс получения таблеток из сухого экстракта Padus Graynae Maxim отражен в рисунке 7.1.1.

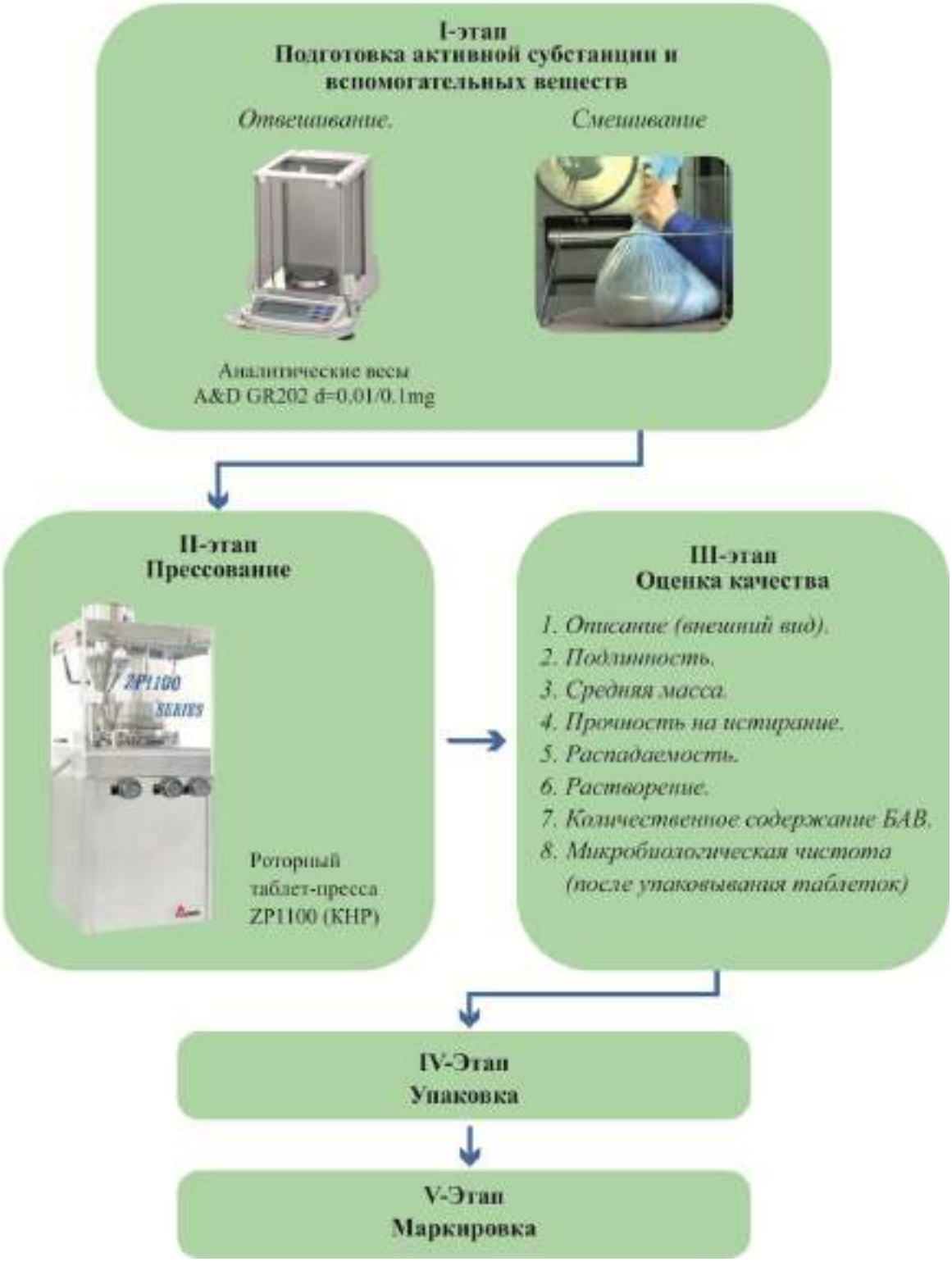


Рис. 7.1.1. Схема технологического процесса получения таблеток из сухого экстракта Padus Graynae Maxim

Технологический процесс

1. Подготовка активной субстанции и вспомогательных веществ

1.1. Отвешивание.

Таблица 6.1.2. - Состав для 1000 таблеток

№	Ингредиенты	Масса (г)
1	Padus Graynae Maxim экстракт сухой	30,0
2	Лактоза (Super Tab 30GR)	184,7
3	Микрокристаллическая целлюлоза (Pharmacel 102)	80,0
4	Кремния диоксид коллоидный (Aerosil 200)	2,3
5	Магния стеарат	3,0
Общая масса		**300,0**

Выбор вспомогательных веществ для таблетирования сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Для сухих растительных экстрактов любая тепловая обработка или соприкосновение с водной средой могут привести к определенным потерям содержащихся в них биологически активных веществ. Следовательно, при разработке и получении лекарственных форм растительных экстрактов желательно учитывать этот фактор учитывать. Поэтому для получения таблеток сухого экстракта Padus Grayanae Maxim была выбрана технология прямого прессования, которая позволяет избежать процессов увлажнения и сушки используемого сухого экстракта. Наполнители (лактоза моногидрат и микрокристаллическая целлюлоза) выбраны в специально формах, специально предназначенных для прямого прессования (Super Tab 30GR и Pharmacel 102 соответственно).

При выборе вспомогательных веществ лактоза моногидрат и микрокристаллическая целлюлоза выбраны как наиболее инертные вещества в отношении растительных экстрактов: лактозы моногидрат уже много десятилетий используется в качестве стабилизатора гигроскопичности многих сухих растительных экстрактов, целлюлоза является структурной частью самих растений. В то же время, оба наполнителя являются частью многих пищевых продуктов и являются безопасными.

Количество двух наполнителей и их соотношение в таблетке обусловлено: данные количества дают хорошую маскировку вкуса экстракта; средний вес таблетки 300 мг более удобен как для приема (внутрь), так и при обращении; обеспечивает относительно хорошую сыпучесть и однородность смеси вспомогательных веществ и активного ингредиента; обеспечивает хорошую прессуемость полученных таблеток; обеспечивает необходимую твердость таблеток при его соответствии требованиям показателей распадаемости и истираемости.

Кремния диоксид коллоидный (аэросил) добавлен в целях улучшения текучести смеси, так как сухой экстракт Padus Grayanae Maxim является аморфным порошком с очень плохой текучестью и, несмотря на добавление наполнителей, влияние экстракта на текучесть смеси остается.

Магния стеарат добавлен как для улучшения текучести смеси, так и для обеспечения легкого выталкивания прессованных таблеток из матрицы (эффект смазывания).

Количества кремния диоксида коллоидного и магния стеарата в таблетке определены в рамках предельных норм их добавления в твердые лекарственные формы и оптимального обеспечения текучести смеси для таблетирования (аэросил) и оптимальной работы пресс-инструмента (пуансонов и матриц) таблет-пресса (магния стеарат).

Отвешивание активного вещества и вспомогательных веществ производилось в отдельные чашечки из полимерного материала на

аналитических весах A&D GR202 d=0.01/0.1mg, максимальная нагрузка на весы 210 г (Япония).

Условия окружающей среды в помещении весовой: температура - 21ºС, относительная влажность - 65-70%. Дополнительного измельчения и просеивания ингредиентов не требуется.

1.2. Смешивание

Около половины отвешенного количества лактозы моногидрата (Super Tab 30GR) помещали в чистый полиэтиленовый пакет (с примерной вместимостью до 5 кг), добавляли отвешенное количество Padus Graynae Maxim экстракта сухого. Затем производили ручное смешивание в течение 5-7 минут, предварительно плотно закрыв полиэтиленовый пакет. Затем в пакет со смесью добавляли оставшееся количество лактозы моногидрата, отвешенные количества микрокристаллической целлюлозы (Pharmacel 102) и кремния диоксида (Aerosil 200) и повторно производили ручное смешивание в течение 7-10 минут. Далее к полученной смеси добавляли отвешенное количество магния стеарата и вновь производили смешивание в течение 3-4 минут.

Учитывая то, что данная смесь приготовлена с использованием специальных вспомогательных веществ, предназначенных для прямого прессования, влажная грануляция не требуется.

2. Прессование

Полученная смесь загружалась в бункер роторного таблет-пресса ZP1100 (КНР), предварительно подготовленного и оснащенного пуансонами и матрицами для прессования таблеток диаметром 9 мм. Пуансоны плоские, с краями для фаски, верхние пуансоны имеют выпуклую линию для риски на таблетках.

Прессование таблеток производилось под давлением 3,8 тонн. Давление предварительного прессования – 0,8-1,0 тонн. На первых 100-200 таблетках

произведена регулировка глубины заполнения матриц таким образом, чтобы получились таблетки со средней массой 300 мг.

После полной регулировки таблет-пресса осуществлен процесс таблетирования и получены плоскоцилиндрические таблетки с риской с одной стороны и фаской, бежевого цвета с вкраплениями от светло-коричневого до коричневого цвета.

Далее производилось обеспыливание полученных таблеток путем пропускания через специальное устройство «обеспыливатель таблеток» (TEDD02, КНР). Полученные таблетки помещались в полиэтиленовые пакеты, которые плотно закрыты и вложены в коробку.

3. Оценка качества

Оценка качества полученных таблеток с сухим экстрактом Padus Graynae Maxim проводилась по следующим показателям:

3.1. Описание (внешний вид).

3.2. Подлинность.

3.3. Средняя масса.

3.4. Прочность на истирание.

3.5. Распадаемость.

3.6. Растворение.

3.7. Количественное содержание БАВ.

3.8. Микробиологическая чистота (после упаковывания таблеток).

Описание

Плоскоцилиндрические таблетки с риской с одной стороны и фаской, бежевого цвета с вкраплениями от светло-коричневого до коричневого цвета.

Подлинность

Подлинность полученных таблеток оценивали путем сравнения времени удерживания основных пиков хлорогеновой и кофейной кислот на хроматограммах раствора испытуемого препарата и растворов стандартных образцов с использованием метода ВЭЖХ.

Примечание: Подлинность препарата устанавливается в одном испытании одновременно с количественным определением биологически активных веществ (хлорогеновой кислоты и кофейной кислоты). Методика проведения испытания на подлинность описана в разделе «количественное определение».

Средняя масса

Для определения средней массы таблеток использовались аналитические весы A&D GR202 d=0.01/0.1mg, максимальная нагрузка на весы 210 г (Япония). Средняя масса таблеток 300 мг. Фактическое отклонение от средней массы таблеток составляет ± 2,5 %, что входит в пределы (± 5 %), установленные Европейской Фармакопеей шестого издания [227].

Прочность на истирание

Прочность на истирание полученных таблеток исследовалась в соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи шестого издания [227] в приборе для определения истираемости таблеток (TAR20, ERWEKA, Германия).

Истирамость полученных таблеток составила 0,6 % что соответствует установленным Европейской Фармакопеей пределам (не более 1,0 %).

Распадаемость.

Распадаемость полученных таблеток изучалась в соответствии с требованиями ГФ X [225] в приборе для определения распадаемости таблеток (ZT31, ERWEKA, Германия).

Распадаемость полученных таблеток составила 6 ± 0,2 минут, что соответствует установленным в ГФ X пределам (не более 15 мин).

Растворение.

Изучение растворимости полученных таблеток проводилось в соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи шестого издания [227] в приборе для определения растворимости таблеток (LID 6D, Vanguard Pharmaceutical Machinery, LLC, США, прибор 2 «Лопастная мешалка»).

Растворимость таблеток оценивалась по содержанию в одной таблетке биологически активного вещества – хлорогеновой кислоты, перешедшей в раствор.

Среда растворения – ацетатный буферный раствор с pH 4,5, объем среды растворения – 500 мл, скорость вращения корзинки – 50 об/мин, время растворения – 45 мин. В каждый сосуд помещали по одной таблетке.

Испытуемый раствор. Через 45 мин отбирали 50 мл из центра сосуда для растворения, фильтровали через мембранный фильтр (0,22 μм), отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

Стандартный раствор хлорогеновой кислоты. 5,0 мг (точная навеска) хлорогеновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 70 мл подвижной фазы. Обрабатывают на ультразвуковой бане в течение 10 минут. Доводят объем раствора до метки 0,1 М раствором хлористоводородной кислоты и перемешивают. 2 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 20 мл, доводят до метки подвижной фазой. Фильтруют через мембранный фильтр (0,22 μм). Определение проводят методом ВЭЖХ.

Количество хлорогеновой кислоты, перешедший в раствор через 45 мин, должно быть не менее 75% от заявленного содержания хлорогеновой кислоты в одной таблетке.

Количественное содержание БАВ

Количественное определение действующих веществ в препарате оценивалось по двум биологически активным веществам, содержащимся в активной субстанции: хлорогеновой и кофейной кислот.

Для проведения анализа 1 г порошка измельченных таблеток помещают в плоскодонную колбу, добавляют 50 $см^3$ 50%-ного этанола, смесь нагревают на водяной бане при 55-60°С в течении 30 мин. Экстракцию повторяют пятикратно. Спиртовые экстракты охлаждают, фильтруют и доводят их объем до 250 $см^3$ 50 %-ным этанолом. Определение проводят методом ВЭЖХ.

Содержание хлорогеновой кислоты и кофейной кислоты в одной таблетке не менее 0,15 мг и 0,01 мг соответственно.

Микробиологическая чистота

Лекарственные средства, субстанции, различные готовые лекарственные формы препаратов, в т.ч. и таблетки, могут быть контаминированы микроорганизмами. В соответствии с требованиями НД допускается лимитированное количество микроорганизмов при отсутствии определенных видов, представляющих опасность для здоровья человека.

Полученные таблетки подвергались испытанию на микробиологическую чистоту в соответствии с требованиями ГФ РФ XII, Часть 1, с. 160 [231].

Таблица 7.1.3. – Показатели микробиологической чистоты таблеток из сухого экстракта Padus Grayanae maxim

Рекомендуемые требования	**Соответствие требованиям**
Общее число аэробных бактерий менее чем 10^4 в 1 г	Соответствует
Общее число грибов менее чем 10^2 в 1 г	Соответствует
Энтеробактерий и других грамотрицательных менее чем 10^2 в 1 г	Соответствует
Escherichia coli, Salmonella и Staphylococcus отсутствуют в 1 г	Соответствует

4. Упаковка

После проведения оценки качества, таблетки упакованы по 10 таблеток в контурную ячейковую упаковку (блистер), состоящую из фольги алюминиевой толщиной 20 микрон, (покрытой термолаком со стороны, подлежащей термосвариванию, с печатью с другой стороны) и поливинилхлоридной (ПВХ) пленки толщиной 250 микрон.

По 5 блистеров помещены в индивидуальную коробку из картона для потребительской тары по ГОСТ 7933-89.

Аппаратурная схема производства таблеток из сухого экстракта Padus Grayanae maxim представлена на рисунке 7.1.2.

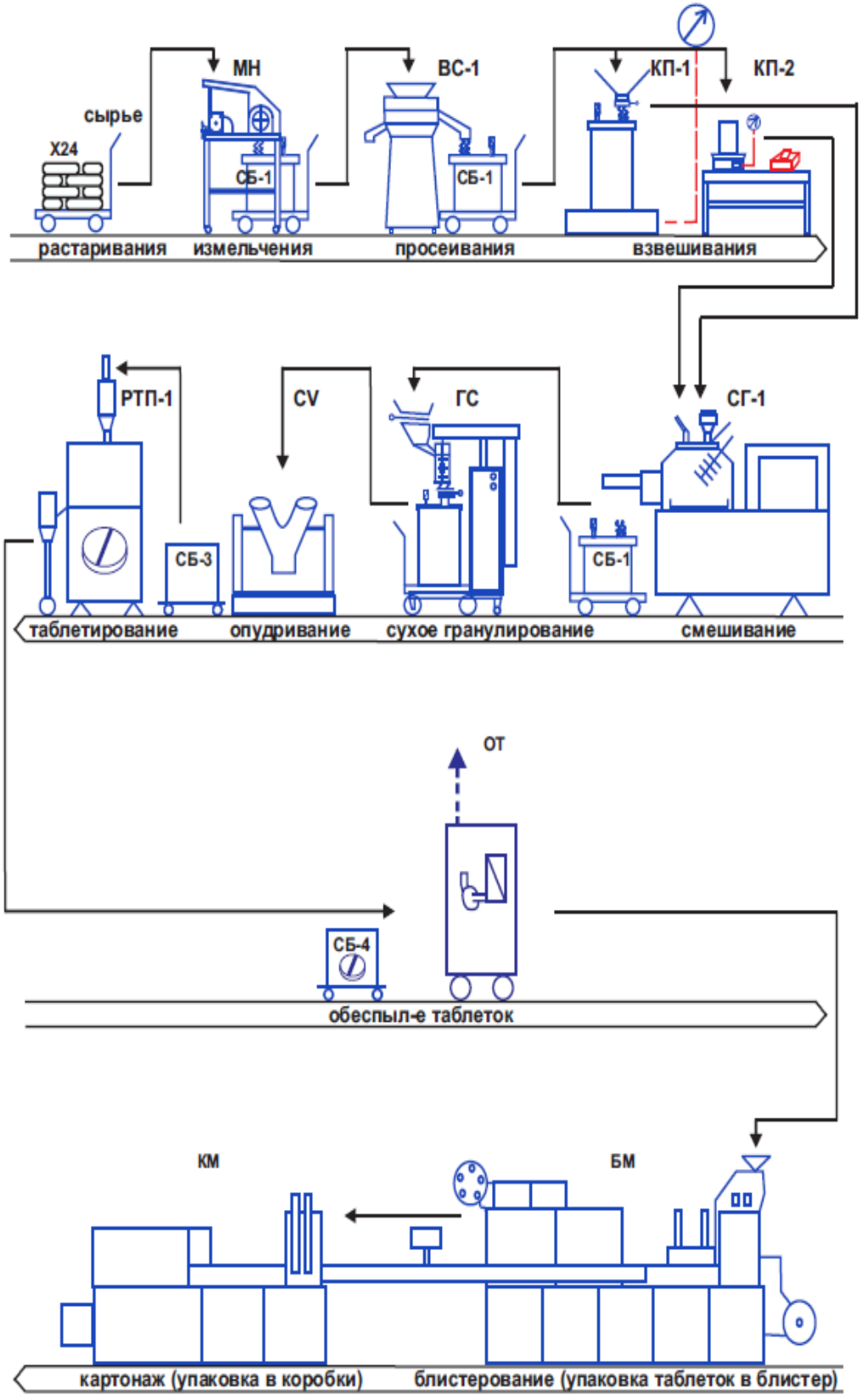


Рис. 7.1.2. Аппаратурная схема производства таблеток из сухого экстракта Padus Grayanae maxim

5. Маркировка

На первичной упаковке указаны: название препарата, доза, лекарственная форма, номер серии (лабораторная).

На коробке индивидуальной указаны: название препарата, доза, лекарственная форма, номер серии (лабораторная), название экспериментальной площадки, где проведены работы по технологии получения таблеток из сухого экстракта Padus Grayanae maxim [302].

7.2. Технологическая разработка и стандартизация капсулированной формы сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Для проведения капсулирования сухого экстракта Padus Graynae Maxim использовалась классическая технология путем наполнения твердых желатиновых капсул активным ингредиентом и подходящими вспомогательными веществами в качестве наполнителей и скользящих.

Ингредиенты:

- *сухой экстракт Padus Graynae Maxim* - порошок светло-желтого, желтого или светло-коричневого цвета со слабым специфическим запахом, гигроскопичен. Гигроскопичность стабилизирована с помощью лактозы моногидрата в соотношении 1 : 2.
- *лактозы моногидрат*, наполнитель. Соответствует требованиям европейской фармакопеи. Поставщик – Vega Pharma Limited, Китай.
- *pharmacel 102* – целлюлоза микрокристаллическая, наполнитель. Соответствует требованиям Фармакопеи США, Европейской фармакопеи и Японской фармакопеи. Производитель – DMV - Fonterra Excipients GmbH & Co.KG, Nörten Hardenberg, Германия.
- *магния стеарат*, смазывающее. Соответствует требованиям европейской фармакопеи. Поставщик – Vega Pharma Limited, Китай.

Выбор вспомогательных веществ для капсулирования сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

Вначале при капсулировании сухого экстракта были использованы в качестве вспомогательных веществ лактозы моногидрат и МКЦ в их обычных модификациях (не предназначенные для прямого прессования). Однако, экспериментально было установлено, что смесь лактозы моногидрата (обычной) и микрокристаллической целлюлозы, предназначенной для прямого прессования (Pharmacel 102) дает лучшие результаты по текучести, сохранения однородности смеси и процесса капсулирования, чем смесь лактозы моногидрата (обычный) и микрокристаллической целлюлозы (обычный).

Количество указанных наполнителей определяется двумя факторами: оптимальные параметры (текучесть, однородность смеси) и оптимальное наполнение выбранного размера капсулы.

Магния стеарат добавлен в целях улучшения текучести смеси в рамках предельных норм их добавления в твердые лекарственные формы.

Подготовка активной субстанции и вспомогательных веществ

Отвешивание активного вещества и вспомогательных веществ произведено на аналитических весах производства A&D GR202 d=0.01/0.1mg, максимальная нагрузка на весы 210 г (Япония).

Условия окружающей среды в помещении весовой: температура 18-22ºС, относительная влажность 65-70%.

Ингредиенты отвешены в отдельные чашечки из полимера.

Примечание: ингредиенты не требуют дополнительного измельчения и просеивания.

Смешивание ингредиентов проведено следующим образом: около половины отвешенного количества лактозы моногидрата помещено в чистый

полиэтиленовый пакет (с примерной вместимостью до 5 кг), добавлено отвешенное количество сухого экстракта Padus Grayanae maxim.

Затем произведено ручное смешивание в течение 5-7 мин, предварительно плотно закрыв полиэтиленовый пакет. Затем в пакет со смесью добавлено оставшееся количество лактозы моногидрата, отвешенные количества микрокристаллической целлюлозы (Pharmacel 102) и повторно произведено ручное смешивание в течение 7-10 минут. К полученной смеси добавлено отвешенное количество магния стеарата и произведено смешивание (опудривание) в течение 3-4 минут.

Наполнение капсул производилось на ручном капсуляторе. Твердые желатиновые капсулы размером №1 размещены в ручной капсулятор и через механические приемы (согласно инструкции по использованию ручного капсулятора) тела капсул расположены вертикально в ячейки капсулятора, с открытым концом вверх таким образом, что верхняя часть капсул лежала в одном горизонте с поверхностью ручного капсулятора.

Полученная смесь по частям загружена в капсулятор и шпателем капсулятора аккуратно заполнена в открытые тела капсул. Затем, через механические процедуры крышки капсул закрыты.

Процедура наполнения капсул повторена до тех пор, пока полностью не использовалась смесь ингредиентов для капсулирования.

Проведено обеспыливание полученных капсул путем пропускания через специальное устройство «обеспыливатель капсул» марки TEDD02, КНР.

Полученные наполненные твердые желатиновые капсулы помещены в полиэтиленовый пакет, плотно закрыть и вложить в коробку.

Оценка качества полученных капсул сухого экстракта Padus Grayanae maxim проведена по следующим показателям.

Описание. Твердые желатиновые капсулы № 1 цилиндрической формы с закругленными концами, белого цвета с красной крышкой. Содержимое

капсул – порошок почти белого цвета с коричневыми и светло-коричневыми частицами.

Подлинность. Подлинность содержимого капсул проводили с использованием метода ВЭЖХ путем сравнения времени удерживания основных пиков хлорогеновой кислоты и кофеиновой кислоты на хроматограмме раствора испытуемого препарата и времени удерживания пиков хлорогеновой кислоты и кофеиновой кислоты на хроматограмме растворов стандартных образцов соответственно.

Примечание: Методика проведения испытания на подлинность описаны в разделе «количественное определение». Подлинность препарата устанавливается в одном испытании одновременно с количественным определением биологически активных веществ (хлорогеновой кислоты и кофеиновой кислоты).

Средняя масса содержимого капсул. Средняя масса содержимого капсул 250 мг. Фактическое отклонение от средней массы содержимого капсул составляет ± 3,36 %, что входят в пределы (± 10 %), установленные Европейской фармакопеей седьмого издания [227]. Средняя масса содержимого капсул определена путем индивидуального взвешивания 20 капсул, сначала наполненных, затем после удаления содержимого и вычислением массы содержимого как разницы двух взвешиваний. Для определения средней массы содержимого капсул использованы аналитические весы производства A&D GR202 d=0.01/0.1mg, максимальная нагрузка на весы 210 г (Япония).

Распадаемость. Исследование распадаемости полученных капсул проведено в соответствии с требованиями Европейской фармакопеи седьмого издания [227] в приборе для определения распадаемости таблеток и капсул (ZT31, ERWEKA, Германия). Фактическая распадаемость полученных капсул составляет не более 10 минут, что входят в пределы норм, установленных в Европейской фармакопее седьмого издания [227] (не более 30 мин).

Растворение. Изучение растворимости полученных капсул проводилось в соответствии с требованиями Европейской Фармакопеи седьмого издания [227] в приборе для определения растворимости капсул (LID 6D, Vanguard Pharmaceutical Machinery, LLC, США, прибор 2 «Лопастная мешалка»). Растворение изучалось по содержанию в одной капсуле биологически активного вещества – хлорогеновой кислоты.

Среда растворения – ацетатный буферный раствор с pH 4,5, объем среды растворения – 500 мл, скорость вращения корзинки – 50 об/мин, время растворения – 45 мин. В каждый сосуд помещают по одной капсуле.

Количество хлорогеновой кислоты, перешедший в раствор через 45 мин, должно быть не менее 75% от заявленного содержания хлорогеновой кислоты в одной капсуле.

Микробиологическая чистота - испытание проведено в соответствии с требованиями ГФ РФ XII [231].

- Общее число аэробных бактерий менее чем 10^4 в 1 г;
- Общее число грибов менее чем 10^2 в 1 г;
- Энтеробактерий и других грамотрицательных менее чем 10^2 в 1 г;
- Escherichia coli, Salmonella и Staphylococcus отсутствуют в 1 г препарате.

Количественное определение действующих веществ в препарате проведено методом ВЭЖХ по двум биологически активным веществам, содержащимся в активной субстанции: хлорогеновой и кофейной кислот.

Содержание хлорогеновой кислоты и кофейной кислоты в одной капсуле не менее 0,15 мг и 0,01 мг соответственно [303].

Технологический процесс получения таблеток из сухого экстракта Padus Graynae Maxim отражен в рисунке 7.2.1.

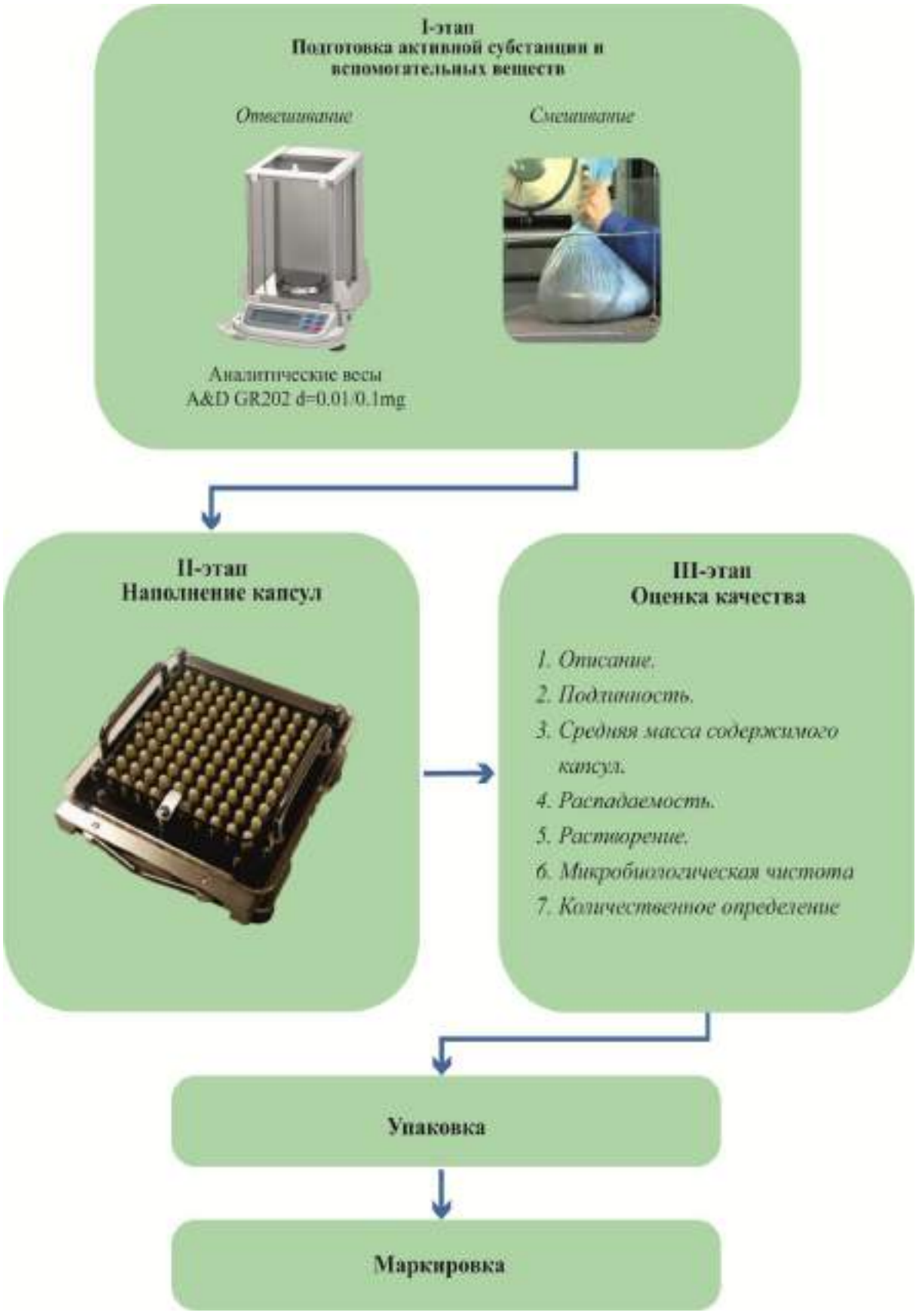


Рис. 7.2.1. Схема технологического процесса получения капсул из сухого экстракта Padus Graynae Maxim

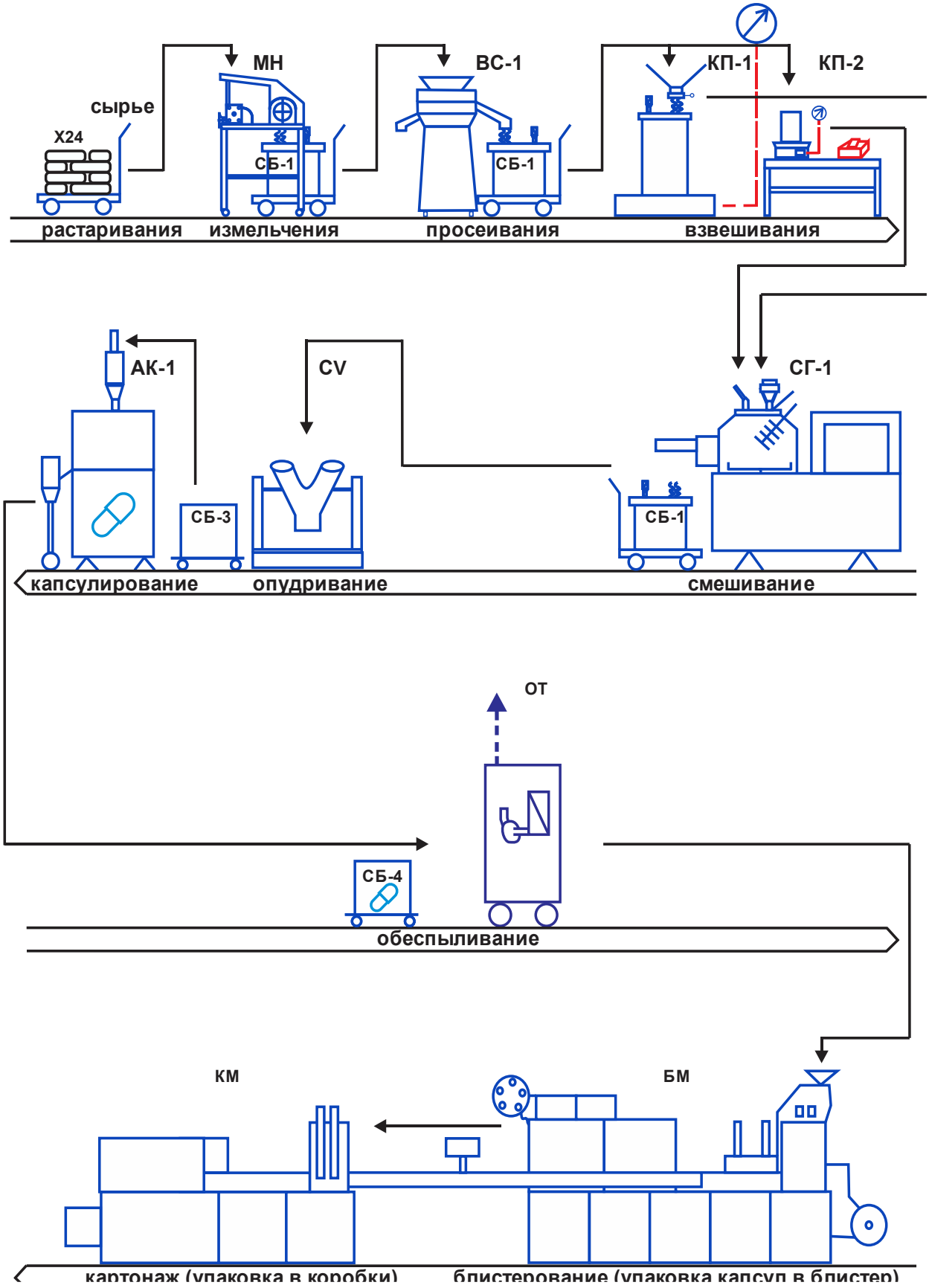


Рис. 7.2.2. Аппаратурная схема производства капсул из сухого экстракта Padus Grayanae maxim

Упаковка

После проведения оценки качества, капсулы упакованы по 10 капсул в контурную ячейковую упаковку (блистер), состоящей из фольги алюминиевой толщиной 20 микрон (покрытой термолаком со стороны, подлежащей термосвариванию, с печатью с другой стороны) и ПВХ (поливинилхлорид) пленки толщиной 250 микрон. По 5 блистеров помещены в индивидуальную коробку из картона для потребительской тары по ГОСТ 7933-89.

Маркировка

На первичной упаковке указаны: название препарата, доза, лекарственная форма, номер серии (лабораторная).

На коробке индивидуальной указаны: название препарата, доза, лекарственная форма, номер серии (лабораторная), название экспериментальной площадки, где проведены работы по технологии получения капсул с экстрактом Padus Grayanae Maxim.

7.3. Технология получения и стандартизация гранул сухого экстракта из надземных частей Padus Grayanae Maxim для приготовления раствора для приема внутрь (саше)

Для получения гранул сухого экстракта Padus Graynae Maxim использована технология влажной грануляции с использованием легколетучего растворителя для быстрой сушки гранулята при невысокой температуре.

Ингредиенты:

1. *Сухой экстракт Padus Graynae Maxim*, полученной сублимационной сушкой этанолового (40%) жидкого экстракта Padus Graynae Maxim, порошок светло-желтого, желтого или светло-коричневого цвета со слабым специфическим запахом, гигроскопичен. Гигроскопичность

стабилизирована с использованием лактозы моногидрата. Соотношение сухого экстракта и лактозы моногидрата 1:2, соответственно.

2. *Лактозы моногидрат, наполнитель*. Соответствует требованиям европейской и американской фармакопеи. Поставщик – Vega Pharma Limited, Китай.
3. *Сорбитол – наполнитель*. Соответствует требованиям европейской и американской фармакопеи. Поставщик – Vega Pharma Limited, Китай.
4. *Коллидон CL-M* – дезинтегрант и стабилизатор. Соответствует требованиям европейской и американской фармакопеи. Поставщик (производитель) – компания BASF, Германия.
5. *Аспартам – подсластитель*. Соответствует требованиям европейской фармакопеи. Поставщик – Panteley Toshev Ltd., Китай.
6. *Ароматизатор лимонный* – ароматизатор. Соответствует требованиям технического регламента ЕАЭС 021/2011 и FCC (Food Chemical Codex). Поставщик – ОсОО «Техника и Логистика», Кыргызстан.
7. *Натрия цитрат* – корректор вкуса. Соответствует требованиям европейской и американской фармакопеи. Поставщик – Vega Pharma Limited, Китай.
8. *Лимонная кислота* (безводная) – регулятор кислотности. Соответствует требованиям европейской и американской фармакопеи. Поставщик – Vega Pharma Limited, Китай.
9. *Коллидон 90 F* – связующее. Соответствует требованиям европейской и американской фармакопеи. Поставщик (производитель) – компания BASF, Германия.
10. *Этанол (спирт этиловый)* - *растворитель*. Соответствует требованиям европейской и американской фармакопеи. Поставщик – ОсОО «Аю», Кыргызстан.

Таблица 7.3.1 - Состав содержимого саше (пакетика)

№	Ингредиенты	Масса (мг)
1	Сухой экстракт Padus Graynae Maxim	30
2	Лактоза моногидрат	60
3	Сорбитол	2385
4	Коллидон CL-M	120
5	Аспартам	100
6	Ароматизатор	160
7	Натрий цитрат	60
8	Лимонная кислота	60
9	Коллидон 90 F	25
10	Этанол 96%	
	Масса сухих гранул	**3000**

Выбор вспомогательных веществ для гранул (в пакетиках) сухого экстракта Padus Grayanae Maxim

При разработке гранул сухого экстракта Padus Grayanae Maxim выбор вспомогательных веществ и их количества обусловлен следующими факторами.

В качестве основного наполнителя выбран сорбитол в оптимальном количестве, как хорошо растворимый в воде ингредиент с приятным сладким вкусом, значительно маскирующим вкус экстракта; для обеспечения хорошей текучести смеси при расфасовке; для обеспечения однородности дозирования/расфасовки (при расфасовки малых количеств порошков и гранул в пакетики затруднено сохранение однородности массы содержимого пакета).

Количества аспартама, натрия цитрата, лимонной кислоты и ароматизатора обусловлены необходимостью обеспечению хорошего вкуса и аромата раствора для приема внутрь, получаемого при растворении гранул.

Раствор Коллидона 90 F в спирте этиловом использован в качестве связующего, их количества оптимальны для получения гранул компонентов смеси. Спирт этиловый выбран в качестве растворителя в силу быстрого улетучивания при сушке и обеспечения более низкой температуры сушки.

Коллидон CL-M использован в качестве эффективного дезинтегранта гранул (при приготовлении раствора гранул для приема внутрь), в количестве, обеспечивающем относительно быстрый распад гранул и их растворение.

Технологический процесс

Подготовка активной субстанции и вспомогательных веществ

Таблица 7.3.2 - Состав для 1000 саше (пакетиков)

№	Ингредиенты	Масса (г)
1	Сухой экстракт Padus Graynae Maxim	30
2	Лактоза моногидрат	60
3	Сорбитол	2385
4	Коллидон CL-M	120
5	Аспартам	100
6	Ароматизатор	160
7	Натрий цитрат	60
8	Лимонная кислота	60
9	Коллидон 90 F	25
10	Этанол 96%	500
	Масса сухих гранул	**3000**

Отвешивание

Отвешивание активного вещества и вспомогательных веществ (за исключением сорбитола) производилось на аналитических весах (A&D GR202 d=0.01/0.1mg Япония), максимальная нагрузка на весы 210 г

Отвешивание сорбитола производилось на электронных весах CAS SW-05 (Южная Корея).

Условия окружающей среды в помещении весовой: температура 18-22 ºС, относительная влажность 65-70%.

Ингредиенты отвешены в отдельные чашечки из полимера и полиэтиленовые пакеты.

В мерный цилиндр отмерен 500 мл этанола 96%.

Примечание: ингредиенты не требуют дополнительного измельчения и просеивания

Смешивание

Около 1/5 часть отвешенного количества сорбитола помещали в чистый полиэтиленовый пакет (с примерной вместимостью до 5 кг), далее были добавлены отвешенные количества всех ингредиентов, кроме коллидона 90 F и этанола. Затем произведено ручное смешивание в течение 7-10 минут, предварительно плотно закрыв полиэтиленовый пакет.

Затем в пакет со смесью, добавлено оставшееся количества сорбитола и повторно произведено ручное смешивание в течение 7-10 мин.

Грануляция

*Подготовка увлажнителя***.** В емкость из нержавеющей стали вместимостью около 1000 мл вливали отмеренное количество этанола 96%, затем добавляли отвешенное количество коллидона 90 F и после смешивания получили раствор увлажнителя.

Влажная грануляция. В емкость из нержавеющей стали вместимостью около 7 кг помещали смесь порошков, добавляли к ней ½ часть увлажнителя и проводили грануляцию ручным смешиванием, предварительно надев стерильные перчатки. По мере смешивания порциями добавляли оставшуюся часть увлажнителя до тех пор, пока не получится влажная масса, которая хорошо комкается при сжатии, но не прилипает к рукам. Полученную влажную массу пропускали через сито из нержавеющей стали с размерами ячеек 1,5 мм.

Сушка гранулята. Полученные влажные гранулы помещали на противни из нержавеющей стали с толщиной слоя около 1 см и сушили при

температуре 55ºС до остаточной влажности 0,5%, периодически перемешивая.

Сухая грануляция. Высушенные гранулы пропускали через сито из нержавеющей стали с размерами ячеек 0,8 мм и собирали в полиэтиленовый пакет для дальнейшей оценки качества и расфасовки.

Оценка качества

Оценка качества полученных гранул сухого экстракта Padus Graynae Maxim проводилась по следующим показателям:

- описание (внешний вид содержимого саше);
- подлинность;
- средняя масса содержимого саше;
- количественное содержание хлорогеновой и кофейной кислот;
- микробиологическая чистота (после проведения первичной упаковки).

Описание

Содержимое саше – гранулы почти белого цвета с коричневыми и светло-коричневыми вкраплениями со слабым характерным запахом.

Подлинность

Подлинность гранул установлена путем сравнения времени удерживания основных пиков хлорогеновой кислоты и кофейной кислоты на хроматограмме раствора испытуемого препарата и времени удерживания пиков хлорогеновой кислоты и кофейной кислоты на хроматограмме растворов стандартных образцов соответственно с использованием метода ВЭЖХ.

Примечание: Методика проведения испытания на подлинность описаны в разделе «количественное определение». Подлинность препарата устанавливается в одном испытании одновременно с количественным определением биологически активных веществ (хлорогеновой кислоты и кофейной кислоты).

Средняя масса содержимого саше

Средняя масса содержимого саше определена путем индивидуального взвешивания содержимого 20 саше. Средняя масса содержимого одного

составила саше 3,0 г. Фактическое отклонение от средней массы содержимого саше составляло ± 3,50 % что входит в пределы (± 7,5 %), установленные Европейской фармакопеей седьмого издания [227].

Для определения средней массы содержимого саше использовались аналитические весы A&D GR202 d=0.01/0.1mg (Япония), максимальная нагрузка на весы 210 г.

Микробиологическая чистота

Испытание проводилось в соответствии с требованиями ГФ РФ XII, Часть 1, с. 160. [231].

Таблица 7.3.3. – Показатели микробиологической чистоты содержимого саше из сухого экстракта Padus Grayanae maxim

Рекомендуемые требования	**Соответствие требованиям**
Общее число аэробных бактерий менее чем 10^4 в 1 г	Соответствует
Общее число грибов менее чем 10^2 в 1 г	Соответствует
Энтеробактерий и других грамотрицательных микроорганизмов менее чем 10^2 в 1 г	Соответствует
Escherichia coli, Salmonella и Staphylococcus отсутствуют в 1 г	Соответствует

Количественное определение

Количественное определение действующих веществ в препарате проводилось по двум биологически активным веществам, содержащихся в активной субстанции: хлорогеновой и кофейной кислот с использованием метода ВЭЖХ.

1 г порошка из содержимого саше помещали в плоскодонную колбу, добавляли 50 $см^3$ 50 %-ного этанола, смесь нагревали на водяной бане при 55-60°С в течении 30 мин. Экстракцию повторяли пятикратно. Полученные спиртовые экстракты охлаждали, фильтровали и доводили их объем до 250 $см^3$ 50 %-ным этанолом.

Условия хроматографирования:

- колонка Zorbax ODS, 5 мкм, 250 х 4,6 мм;

- предколонка – ODS, 5 мкм, 20 х 4,6 мм;
- объем инъекции 20 мкл;
- подвижная фаза: Градиентный режим. Смешивается метанол и 1,5% уксусная кислота в соотношении от 20:80 до 40:60 в течение 60 минут.
- скорость потока: 1см^3/мин;
- температура колонки - 45°С
- длина волны: 275 нм.

Содержание действующих веществ (мг) в одном саше вычисляли по формуле 7.1:

Формула 7.1.

$$X = \frac{S_1 * \ m_0 * V_1 * P * 100 * a}{S_0 * V_0 * \ m_1 * 100 * (100 - W) * 1000}$$

где:

S_1 = площадь основного пика на хроматограмме испытуемого образца;

S_0 = площадь основного пика на хроматограмме стандартного образца;

m_1 - масса навески препарата, в миллиграммах;

m_0 - масса навески стандартного образца, в миллиграммах;

V_1 – объем разведения испытуемого образца, в миллилитрах;

V_0 – объем разведения стандартного образца, в миллилитрах;

P - чистота стандартного образца, в процентах;

W – содержание влаги в испытуемом образце, в процентах;

a – средняя масса содержимого саше.

Приготовление раствора стандартного образца. Навески по 5 мг стандартных образцов хлорогеновой и кофейной кислот помещали в мерные колбы объемом 100 мл, добавляли по 70 мл 50 % раствора этанола и растворяли с помощью ультразвуковой бани в течение 5 минут. Далее доводили объемы растворов до метки 50 % раствором этанола. Из каждого раствора брали по 20 мл, помещали в мерные колбы объемом 100 мл и доводили объемы растворов до метки 50 % раствором этанола (по 0,1 мг/мл).

Содержание хлорогеновой и кофейной кислот в одно саше не менее 0,15 мг и 0,01 мг соответственно. Технологический процесс получения саше из сухого экстракта Padus Graynae Maxim отражен в рисунке 7.3.1.

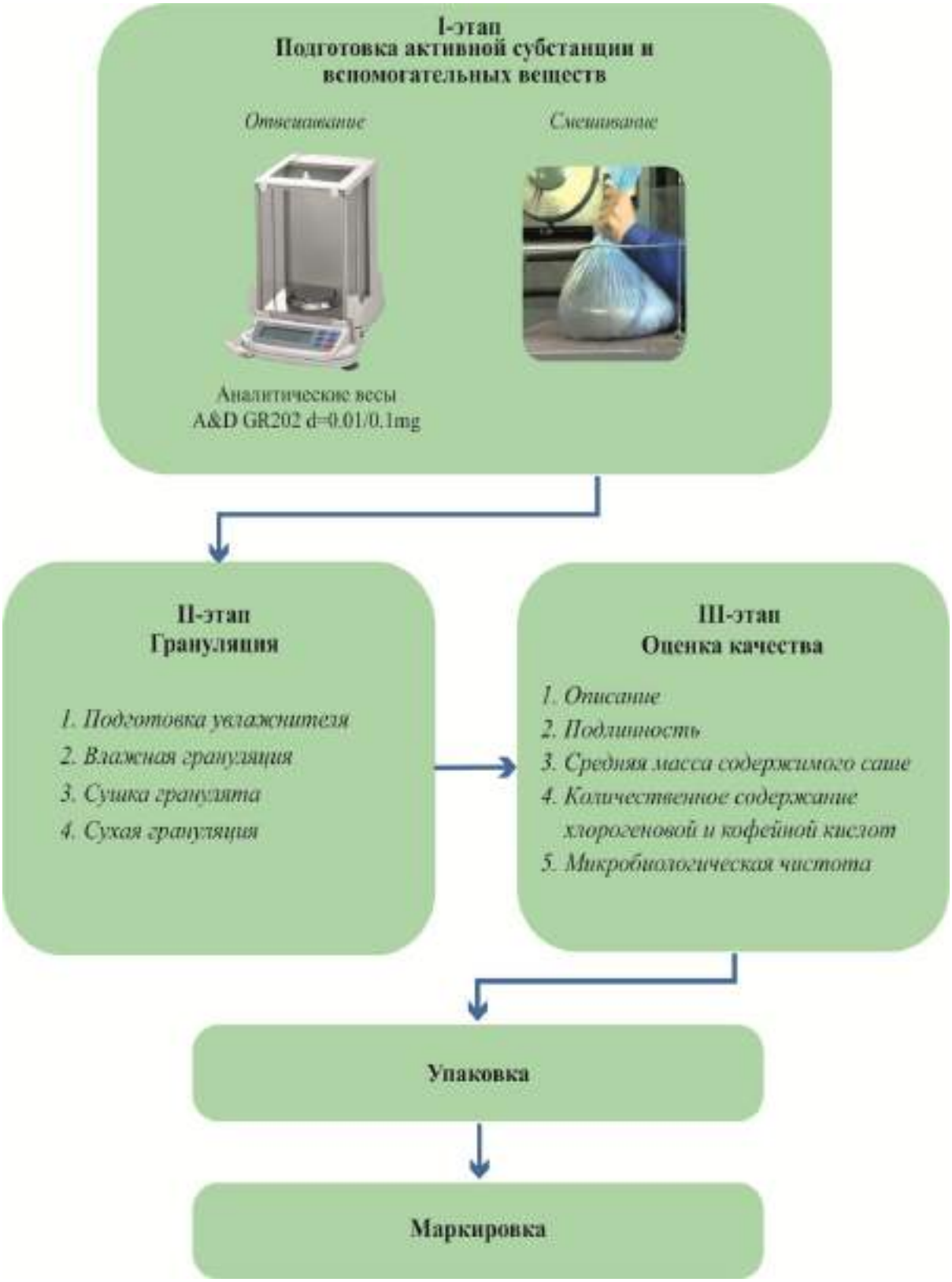


Рис. 7.3.1.. Схема технологического процесса получения саше из сухого экстракта Padus Graynae Maxim

Упаковка

После проведения оценки качества гранулы расфасованы по 3,0 г в саше, состоящее из трехслойного материала (бумага, фольга алюминиевая, полиэтиленовый слой для термосваривания). Стороны саше закрывали путем термического сваривания в аппарате для расфасовки порошков и гранул в саше.

По 10 саше помещали в индивидуальную коробку из картона для потребительской тары по ГОСТ 7933-89.

Маркировка

На первичной упаковке указаны: название препарата, доза, лекарственная форма, номер серии (лабораторная).

На коробке индивидуальной указаны: название препарата, доза, лекарственная форма, номер серии (лабораторная), название экспериментальной площадки, где проведены работы по технологии получения гранул сухого экстракта Padus Graynae Maxim для приготовления раствора для приема внутрь.

ВЫВОДЫ

1. На фармацевтическом рынке КР наибольшую часть ассортимента иммуномодуляторов составляют группа «L03AX Иммуностимуляторы другие» – представленная 16 торговым наименованием ЛС, и группа «L03AB Интерфероны», представленная 6 торговыми наименованиями ЛС. В структуре поставок иммуномодуляторов лидирующую позицию занимает Россия (60,71%). Наиболее экономически доступные иммуномодуляторы на фармрынке Кыргызской Республики представлены твердыми лекарственными формами (53,57%).
2. Разработаны технологические параметры эффективного и экологически безопасного получения сухого экстракта из надземных частей Padus Grayanae maxim с выходом сухой субстанции от 6 до 7% и регламентируемые показатели для его стандартизации согласно фармакопейным требованиям.
3. Установлен качественный и количественный состав БАВ сухого экстракта Padus Grayanae Maxim: аскорбиновая кислота, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, рутин, кверцетин, олиго-, моно- и полисахариды, макро- и микроэлементы, разработаны и валидированы методики их определения для его стандартизации.
4. При изучении острой токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim на мышах и крысах при внутрижелудочном пути введения не удалось установить средней смертельной дозы ($ЛД_{50}$), поскольку в максимальной дозе 2000 мг/кг не приводило к гибели животных, что позволяет отнести сухой экстракт Padus Grayanae Maxim к 5 классу токсичности по международной системе классификации токсичности веществ GHS.
5. Изучение хронической токсичности при введении фитоэкстракта Padus Grayanae Maxim в дозах 300, 600 и 900 мг/кг в течение 30 и 90 суток не выявило отрицательного влияния изучаемого фитоэкстракта на общее

состояние, массу тела, показатели периферической крови, биохимические параметры сыворотки крови и морфологическую картину внутренних органов экспериментальных животных.

6. Установлено, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim дозозависимо подавляет гипервоспалительную реакцию при септической стафилококковой инфекции у экспериментальных животных, увеличивает выживаемость мышей до 80 % и нормализует показатели периферической крови. На экспериментальной септической модели у мышей, индуцированной клиническим изолятом *Staphylococcus aureus*, установлено, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim обладает иммуномодулирующим действием.
7. В исследованиях *in vitro* установлено отсутствие активации ИФН-γ и подавление продукции IL-1β и TNF-α стимулированных МНК липополисахаридом грамотрицательных бактерий, что прямо указывает на противовоспалительную активность сухого экстракт Padus Grayanae Maxim.
8. Установлено, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim в условиях in vitro обладает противоопухолевым действием в отношении линий опухолевых клеток аденокарциномы желудка человека, цервикальной аденокарциномы человека, панкреатической карциномы человека и рабдомиосаркомы мышей.
9. В условиях in vitro показано, что сухой экстракт Padus Grayanae Maxim обладает умеренно выраженными антиоксидантными свойствами, сопоставимыми с фитопрепаратом Эхинацеи пурпурной (Иммунал).
10. Разработанные готовые твердые лекарственные формы с сухим экстрактом Padus Grayanae Maxim для перорального приема в форме таблеток, капсул и саше, соответствуют фармакопейным требованиям.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные данные о противовоспалительном, иммуномодулирующем и противоопухолевом действии сухого экстракта Padus Grayanae Maxim уточняют спектр фармакологической активности и механизм его действия, что позволяют рекомендовать дальнейшее изучение его клинической эффективности и безопасности в качестве иммуномодулирующего средства.

Разработанная технология и методы стандартизации твердых лекарственных форм сухого экстракта из надземных частей Padus Grayanae Maxim являются экспериментально-теоретическим обоснованием внедрения в производственный процесс для получения опытно-промышленных партий фитопрепарата Padus Grayanae Maxim.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии [Текст] / Т.В. Самбукова, Б.В. Овчинников, В.П. Ганопольский [и др.] // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017. – Т. 15, № 2. – С. 56-63.
2. Федько, И. В. Лекарственные растения – возможные источники основных макро- и микроэлементов [Электронный ресурс] / И.В. Федько // Концепт: науч.-метод. электрон. журн. – 2013. – Т. 3. – С. 526-530. – Режим доступа: URL: http://e-koncept.ru/2013/53107.htm. – Загл. с экрана.
3. Григорян, Э.Р. Развитие ВОЗ в области народной медицины [Текст] / Э.Р. Григорян, С.А. Парфейников // Науч. обозрение. Мед. науки. – 2015. – № 1. – С. 139-140.
4. Use of complementary and alternative medicine by children in Europe: published data and expert perspectives [Text] / T.J. Zuzak, J. Bonkova, D. Careddu [et al.] // Complement Ther Med. – 2013. – Vol. 21, suppl. 1. – P. 34-47.
5. Wu C.-H. Changes in herb and dietary supplement use in the US adult population: a comparison of the 2002 and 2007 national health interview surveys [Text] / C.-H. Wu, C.-C. Wang, J. Kennedy // Clin Ther. – 2011. – Vol. 33, N 11. – P. 1749-1758.
6. De Smet, P.A. Herbal remedies [Text] / P.A. De Smet // New Engl J. Med. – 2002. – Vol. 347, N 25. – P. 2046-2056.
7. Фитотерапия: современное состояние вопроса [Текст] / Л.Р. Селимзянова, Е.А. Вишнёва, М.В. Федосеенко, Е.А. Промыслова // Педиатр. фармакология. – 2016. – Т. 13, № 5. – С. 488-493.
8. WHO traditional medicine strategy 2002–2005 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.who.int/medicines/publications/traditionalpolicy/en/. – Загл. с экрана.

9. Стратегия ВОЗ в области традиционной медицины на период с 2014-2023 гг. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/92455/11/9789244506097_rus.pdf?ua=1. – Загл. с экрана.
10. Борисов, А.Г. Клиническая характеристика нарушения функции иммунной системы [Текст] / А.Г. Борисов // Мед. иммунология. – 2013. – Т. 15, № 1. – С. 45-50.
11. Аллергология и иммунология [Текст]: нац. рук. / гл. ред.: акад. Р.М. Хаитов, проф. Н.И. Ильина. – М.: ГЭОТАР-медиа, 2014. – 656 с.
12. Иммунотерапия [Текст]: рук. / под ред. Р.М. Хаитова, Р.И. Атауллаханова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 672 с.
13. Новикова, И.А. Современные аспекты клинического применения иммуномодуляторов [Текст] / И.А. Новикова // Мед. новости. – 2015. – № 5. – С. 23-26.
14. Сепиашвили, Р.И. Иммуномодулирующие препараты в клинической практике: классификация, основные принципы и методы применения, показания и противопоказания [Текст] / Р.И. Сепиашвили //Аллергология и иммунология. – 2015. – Т. 16, № 2. – С 189-195.
15. Головкин, Д.Н. Концепции фитотерапии в практике врача-педиатра [Электронный ресурс] / Д.Н. Головкин, О.В. Шарова, А.В. Куркина // Соврем. проблемы науки и образования. – 2017. – № 5. – Режим доступа: URL: https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=27083. – Загл. с экрана.
16. Булаев, В.М. Безопасность и эффективность лекарственных растений [Текст] / А.М. Булаев, Е.В. Ших, Д.А. Сычев. – М.: Практ. медицина, 2013. – 271 с.
17. Лекарственные средства растительного происхождения в современных лекарственных формах: характеристика и классификация [Текст] / И.В. Сакаева, Н.Д. Бунятян, Е.И. Саканян [и др.] // Ведомости Науч. центра экспертизы средств мед. применения. – 2013. – № 4. – С. 51-58.

18. Актуальные проблемы стандартизации фитопрепаратов и растительного сырья для их производства [Текст] / А.П. Богоявленский, П.К. Алексюк, А.С. Турмагамбетова, В.Э. Березин // Фундам. исслед. – 2013. – № 6/5. – С. 1184-1187.
19. Алексеев, Л.П. Регуляторная роль иммунной системы в организме [Текст] / Л.П. Алексеев, Р.М. Хаитов // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2010. – Т. 96, № 8. – С. 787-805.
20. Борисов, А.Г. Кластерный анализ типов иммунных нарушений при инфекционно-воспалительных заболеваниях [Текст] / А.Г. Борисов // Рос. иммунол. журн. – 2014. – Т. 8 (17), № 4. – С. 1002-1011.
21. Винницкий, Л.И. Оценка иммунного статуса – залог своевременной и успешной иммунокорригирующей терапии в хирургической клинике [Текст] / Л.И. Винницкий, К.А. Бунятян, Е.В. Инвияева // Рос. аллергол. журн. – 2008. – № 1. – Прил. 1. – С. 60-61.
22. Дранник, Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология [Текст] / Г.Н. Дранник. – 4-е изд., доп. – Киев: Полиграф плюс, 2010. – 552 с.
23. Иммунодефициты, сочетающиеся с другими значительными дефектами в Пермском крае [Текст] / Е.В. Троицкая, Т.Ю. Цветкова, Л.В. Софронова, Г.В. Чистоусова // XV Конгресс педиатров России с междунар. участием «Актуальные проблемы педиатрии»: сб. материалов. – М., 2011. – С. 881.
24. Караулов, А.В. Иммунотерапия инфекционных болезней: проблемы и перспективы [Текст] / А.В. Караулов, О.В. Калюжин // Терапевт. Архив – 2013. – Т. 85, № 11. – С. 100-108.
25. Ковальчук, Л.В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии [Текст]: учеб. / Л.В. Ковальчук, Л.В. Ганковская, Р.Я. Мешкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 768 с.
26. Нестерова, И.В. Вторичные иммунодефициты – объективная реальность: необходимость корректной диагностики и адекватной иммунотерапии [Текст] / И.В. Нестерова // Рос. аллергол. журн. – 2008. – № 1. – Прил. 1. – С. 199-203.

27. Основы клинической иммунологии [Текст] / Э. Чепель, М. Хейни, С. Мисбах, Н. Сновден. – 5-изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 416 с.
28. Симонова, А.В. Оценка новых звеньев иммунопатогенеза при хронических инфекционных заболеваниях. Новые подходы к лечению [Текст] / А.В. Симонова, Ж.Р. Газарян // Материалы 2-й Моск. междунар. конф. «Естественный аутоиммунитет в норме и патологии». – М., 2008. – С. 191-193.
29. Хаитов, Р.М. Иммунология. Норма и патология [Текст] / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2010. – 752 с.
30. Сетдикова, Н.Х. Диагностика и лечение врожденных иммунодефицитов [Текст] / Н.Х. Сетдикова // Лечащий врач. – 2006. – № 1. – С. 22-24.
31. Сепиашвили, Р.И. Основы физиологии иммунной системы [Текст] / Р.И. Сепиашвили. – М.: Медицина – Здоровье, 2003. – 396 с.
32. Бурместер, Г.-Р. Наглядная иммунология [Текст]: пер. с англ. / Г.-Р. Бурместер, А. Пецутто. – М.: БИНОМ. Лаб. знаний, 2007. – 320 с.
33. Назаренко, Г.И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований [Текст] / Г.И. Назаренко, А.А. Кишкун. – М.: Медицина, 2000. – 544 с.
34. Медицинские стандарты (протоколы) диагностики и лечения больных с аллергическими заболеваниями и нарушениями иммунной системы [Текст]. – 2-е изд., доп. и перераб. – М.: МЗиСР РФ, 2001. – 120 с.
35. Караулов, А.В. Иммуномодуляция при респираторных инфекциях: от понимания целей и механизмов действия к клинической эффективности [Текст] / А.В. Караулов // Детский инфекции. – 2012. – Т. 11, № 3. – С. 62-64.
36. Иммунология детского возраста [Текст] / под ред. А.Ю. Щербины, Е.Д. Пашанова. – М.: Медпрактика-М, 2006. – 432 с. – (Практ. рук. по дет. болезням; Т. 8).

37. Васильев, А.А. Сезонные и возрастные изменения иммунного статуса персонала Горно-химического комбината Красноярского края [Текст]: дис. ... канд. мед. наук / А.А. Васильев. – М., 2009. – 242 с.
38. Наровлянский, А.Н. Интерфероны: перспективные направления исследований [Текст] / А.Н. Наровлянский, Ф.И. Ершов, А.Л. Гинцбург // Иммунология. – 2013. – Т. 34, № 3. – С. 168-172.
39. Иммунопрофилактика острых респираторных инфекций [Текст] / А.Л. Заплатников, А.А. Гирина, Н.С. Глухарева [и др.] // Лечащий врач. – 2015. – № 4. – С. 1-5.
40. Егорова, Н.Б. Иммунотерапевтическая концепция использования микробных антигенов при атопии и патологии, ассоциированной с условно патогенной микрофлорой (на примере поликомпонентной вакцины Иммуновак ВП [Текст] / Н.Б. Егорова, Е.А. Курбатова // Мед. иммунология. – 2008. – Т. 10, № 1. – С. 13-20.
41. Астафьева, Н.Г. Анализ использования иммуномодулирующих препаратов в педиатрической практике [Текст] / Н.Г. Астафьева // Рос. аллергол. журн. – 2008. – № 1. – Прил. 1. – С. 18-19.
42. Вишнякова, Т.М. Влияние тималина на динамику цитокинов у детей с инфекционным эндокардитом [Электронный ресурс] / Т.М. Вишнякова, А.Б. Долина // Забайкал. мед. вестн. – 2010. – № 1.– С. 12-14. – Режим доступа: http://medacadem.chita.ru/zmv. – Загл. с экрана.
43. Балаболкин, И.И. Эффективность применения препарата ИРС 19 в комплексной терапии детей с аллергическими заболеваниями [Текст] / И.И. Балаболкин, В.А. Булгакова, Т.Б. Сенцова // Материалы науч.-практ. конф. «Фармакотерапия и фармакокинетика в педиатрии». – М., 2000. – С. 5.
44. Заплатников, А.Л. Иммунокорректоры бактериального происхождения в профилактике и лечении респираторных инфекций у детей [Текст] / А.Л. Заплатников // Рос. педиатр. журн. – 2002. – № 1. – С. 45-48.

45. Заплатников, А.Л. Иммунопрофилактика и иммунотерапия острых респираторных инфекций у детей [Текст] / А.Л. Заплатников // Лечащий врач. – 2009. – № 9. – С. 50-56.
46. Ончул, Л. Первичные иммунодефициты. Актуальные проблемы диагностики и лечения [Текст] / Л. Ончул // Здоровье ребенка. – 2015. – № 4 (64). – С. 92-96.
47. Колбин, А.С. Применение иммуностимуляторов при острых инфекциях дыхательных путей у детей: Зарубежный опыт – взгляд с позиций доказательной медицины [Текст] / А.С. Колбин, А.В. Харчев // Педиатр. фармакология. – 2007. – Т. 4, № 3. – С. 27-34.
48. Караулов, А.В. [Комментарий к статье Колбина А.С., Харчева А.В. Применение иммуностимуляторов при острых инфекциях дыхательных путей у детей: Зарубежный опыт – взгляд с позиций доказательной медицины] [Текст] / А.В. Караулов // Педиатр. фармакология. – 2007. – Т. 4, № 4. – С. 25-26.
49. Аллергология и иммунология [Текст]: клин. рек. для педиатров / под общ. ред. А.А. Баранова, Р.М. Хаитова. – Педиатр. 2011. – 248 с.
50. Хаитов, Р.М. Иммунология [Текст]: учеб. / Р.М. Хаитов. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – С. 175-233.
51. Lymphoproliferative disorders in children with primary immunodeficiencies: immunological status may be more predictive of the outcome than other criteria [Text] / D. Canioni, N. Jabado, E. MacIntyre [et al.] // Histopathology. – 2001. – Vol. 38, iss. 2. – P. 146-159.
52. Иммунодефициты: принципы диагностики и лечения [Текст]: в помощь практ. врачу / Н.Х. Сетдикова, Т.В. Латышева, Б.В. Пинегин Б.В. [и др.]. – М.: Фармарус Принт, 2006. – 20 с.
53. Койко, Р. Иммунология [Текст] / Р. Койко, Д. Сайншайн, Э. Бенджамини. – М.: Академия, 2008. – 362 с.
54. Симонова, А.В. Новые подходы к оценке иммунного статуса при хронических инфекционных и воспалительных заболеваниях человека

[Текст] / А.В. Симонова // Материалы 1-й Моск. междунар. конф. «Естественный аутоиммунитет в норме и патологии». – М., 2005. – С. 91–92.

55. Пащенков, М.В. Изучение условий дифференцировки CD4+ цитотоксических Т-лимфоцитов [Текст] / М.В. Пащенков, Б.В. Пинегин // Рос. аллергол. журн. – 2011. – Т. S4-1: Тр. XI Междунар. конгр. «Современные проблемы иммунологии, аллергологии и иммунофармакологии». – С. 284-286.
56. Faner, R. Immune response in chronic obstructive pulmonary disease [Text] / R. Faner, T. Cruz, A. Agusti // Expert Rev. Clin. Immunol. – 2013. – Vol. 9. – P. 821–833.
57. Molekulyarno-geneticheskaja diagnostika: (Molecular-genetic theory) [Text] / M.A. Churina, Y.V. Ostankova, A.V. Semenov A.V. [et al.] // Med. Immunol. – 2015. – Vol. 17. – P. 240.
58. Cunningham-Rundles, C. Common variable immune deficiency: reviews, continued puzzles, and a new registry [Text] / C. Cunningham-Rundles, A.K. Knight // Immunol. Res. – 2007. – Vol. 38, N 1/3. – P. 78-86.
59. Колхир, П.В. Доказательная аллергология-иммунология [Текст] / П.В. Колхир. – М.: Практ. медицина, 2014. – 527 с.
60. Атауллаханов, Р.И. Иммунитет и инфекции. Динамическое противостояние живых систем [Текст] / Р.И. Атауллаханов, А.Л. Гинзбург // Дет. инфекции. – 2005. – Т. 4, №1. – С. 11-21.
61. Новиков, Д.К. Клиническая иммунология [Текст]: учеб. пособие для студентов учреждений, обеспечивающих получение высш. мед. образования / Д.К. Новиков, П.Д. Новиков. – Витебск: ВГМУ, 2006. – 392 с.
62. Караулов, А.В. Вторичные иммунодефицитные состояния: молекулярно-биохимические механизмы развития и методы коррекции [Текст] / А.В. Караулов // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2000. – № 1. – С. 24-25.

63. Бочарова, К.А. Современные аспекты диагностики первичных иммунодефицитных состоянии [Текст] / К.А. Бочарова // Науч. ведомости Белгород. гос. ун-та. Медицина. Фармация. – 2010. – Вып. 12, № 22 (93). – С. 14-24.
64. Кондратенко, И.В. Первичные иммунодефициты [Текст] / И.В. Кондратенко, А.А. Бологов. – М.: Медпрактика-М, 2005. – 231 с.
65. Первичные иммунодефицитные состояния в Пермском регионе: распространённость, клиническая характеристика, проблемы диагностики и лечения [Текст] / Е.В. Троицкая, Л.В. Софронова, Т.Ю. Цветкова, В.В. Смышляева // Перм. мед. журн. – 2010. – Т. 27, № 4. – С. 5-11.
66. Пинегин, Б.В. Иммунодефицитные состояния: возможности применения иммуномодуляторов [Текст] / Б.В. Пинегин, Т.В. Латышева // Лечащий врач. – 2001. – № 3. – С. 48-50.
67. Опыт применения иммуномодулирующих препаратов у больных с первичными иммунодефицитами и синдромом вторичной иммунной недостаточности [Текст] / Н.Х. Сетдикова, Т.В. Латышева, Ю.А. Горностаева [и др.] // Физиология и патология иммун. системы. – 2004. – № 2. – С. 92-99.
68. Щербина, А.Ю. Маски первичных иммунодефицитных состояний: проблемы диагностики и терапии [Текст] / А.Ю. Щербина // Рос. журн. дет. гематологии и онкологии. – 2016. – Т. 3, № 1. – С. 52-58.
69. Щербина, А.Ю. Первичные иммунодефицитные состояния: вопросы диагностики и лечения [Текст] / А.Ю. Щербина, Т.Г. Косачева, А.Г. Румянцев // Вопр. гематологии / онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2010. – Т. 9. № 2. – С. 23-31.
70. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency [Text] / W. Al-Herz, A. Bousfiha, J.L. Casanova [et al.] // Front. Immunol. – 2014. – Vol. 5. – P. 162.

71. Arkwright, P.D. Ten warning signs of primary immunodeficiency: a new paradigm is needed for the 21st century [Text] / P.D. Arkwright, A.R. Gennery // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2011. – Vol. 123, N. 8. – P. 7-14.
72. Single-Center Experience of Unrelated and Haploidentical Stem Cell Transplantation with TCRαβ and CD19 Depletion in Children with Primary Immunodeficiency Syndromes [Text] / D. Balashov, A. Shcherbina, M. Maschan [et al.] // Biol. Blood Marrow Transplant. – 2015. – Vol. 21, N 11. – P. 1955-1962.
73. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency diseases [Text] / F.A. Bonilla, I.L. Bernstein, D.A. Khan [et al.] // Ann. allergy asthma and immunol. – 2005. – Vol. 94, N 5, suppl. 1. – P. 1-63.
74. The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies [Text] / A. Bousfiha, L. Jeddane, W. Al-Herz [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2015. – Vol. 35, N 8. – P. 727-738.
75. Primary immunodeficiency diseases worldwide: more common than generally thought [Text] / A.A. Bousfiha, L. Jeddane, F. Ailal [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2013. – Vol. 33, N 1. – P. 1-7.
76. Boyle, J.M. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States [Text] / J.M. Boyle, R.H. Buckley // J. Clin. Immunol. – 2007. – Vol. 27, N 5. – P. 497-502.
77. Primary immunodeficiency diseases in different age groups: a report on 1,008 cases from a single Brazilian reference center [Text] / M. Carneiro-Sampaio, D. Moraes-Vasconcelos, C.M. Kokron [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2013. – Vol. 33, N 4. – P. 716-724.
78. Cunningham-Rundles, C. Key aspects for successful immunoglobulin therapy of primary immunodeficiencies [Text] / C. Cunningham-Rundles // Clin. Immunol. – 2011. – Vol. 164, N 2. – P. 16-19.
79. De Vryz , E. Mnogostupenchatyi diagnosticheski i protocol skriniga pacientov nanalichie pervichnogo immunodeficita, razrabotanny j dlja vrachej-

neimmunologov: (Multistage diagnostic protocol screening patients for the presence of primary immunodeficiency, designed for doctorsnot an immunologist) [Text] / E. de Vryz // Med. Immunol. – 2013. – Vol. 15, N 5. – P. 477-492.

80. Improving current immunoglobulin therapy for patients with primary immunodeficiency: quality of life and views on treatment [Text] / T. Espanol, J. Prevot, J. Drabwell [et al.] // Patient Prefer Adherence. – 2014. – Vol. 8. – P. 621-629.
81. Lentiviral vectors for the treatment of primary immunodeficiencies [Text] / G. Farinelli, V. Capo, S. Scaramuzza, A. Aiuti // J. Inherit Metab. Dis. – 2014. – Vol. 37, N 4. – P. 525-533.
82. Gene therapy for primary immunodeficiencies [Text] / A. Fischer, S. Hacein-Bey Abina, F. Touzot, M. Cavazzana // Clin. Genet. – 2015. – Vol. 88, N 6. – P. 507-515.
83. Folds, J.D. Clinical and laboratory assessment of immunity [Text] / J.D. Folds, J.L. Schmitz // J. Allergy Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 111, suppl. 2. – S. 702-711.
84. Gardulf, A. Replacement IgG therapy and self-therapy at home improve the health-related quality of life in patients with primary antibody deficiencies [Text] / A. Gardulf, U. Nicolay // Curr. Opin Allergy Clin. Immunol. – 2006. – Vol. 6, N 6. – P. 434-442.
85. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2006- 2008 [Text] / B. Gathmann, B. Grimbacher, J. Beaute [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2009. – Vol. 157, suppl. 1. – P. 3-11.
86. Validity of Primary Immunodeficiency Disease Diagnoses in United States Medicaid Data [Text] / H. Hernandez-Trujillo, J.S. Orange, J.A. Roy [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2015, Vol. 35, N 6. – P. 566-572.
87. Капустина, А.С. Клинические проявления, иммунологические особенности и эффективность терапии первичных иммунодефицитов у

взрослых [Текст]: дис. ... канд. мед. наук / А.С. Капустина. – М., 2011. – 131 с.

88. Kobrynski, L. Prevalence and morbidity of primary immunodeficiency diseases, United States 2001– 2007 [Text] / L. Kobrynski, R.W. Powell, S. Bowen // J. Clin. Immunol. – 2014. – Vol. 34, N 8. – P. 954-961.
89. The Duesseldorf Warning Signs for Primary Immunodeficiency: Is it Time to Change the Rules? [Text] / P. Lankisch, J. Schiffner, S. Ghosh [et al.] // J. Clin. Immunol. – 2015. – Vol. 35, N 3. – P. 273-279.
90. Lehman, H. Diagnosing Primary Immunodeficiency: A Practical Approach for the Nonimmunologist [Text] / H. Lehman, V. Hernandez-Trujillo, M. Ballow // Curr. Med. Res. Opin. – 2015. – Vol. 31, N 4. – P. 697-706.
91. Primary Immunodeficiency Diseases: A 20 Years Experience in a Tertiary University Hospital at Ramathibodi [Text] / O. Luecha, W. Kamchaisatian, S. Vilaiyuk [et al.] // J. Allergy and Clin. Immunol. – 2012. – Vol. 129, N 2. – P. 158.
92. Global study of primary immunodeficiency diseases (PI)-diagnosis, treatment, and economic impact: an updated report from the Jeffrey Modell Foundation [Text] / V. Modell, B. Gee, D.B. Lewis [et al.] // Immunol. Res. – 2011. – Vol. 51, N 1. – P. 61-70.
93. Моисеева, Т.Н. Первичные иммунодефициты. Результаты проспективного наблюдения [Текст]: дис. ... канд. мед. наук / Т.Н. Моисеева. – Челябинск, 2009. – 219 с.
94. Impact of trough IgG on pneumonia incidence in primary immunodeficiency: A meta-analysis of clinical studies [Text] / J.S. Orange, W.J. Grossman, R.J. Navickis, M.M. Wilkes // Clin. Immunol. – 2010. – Vol. 137, N 1. – C. 21-30.
95. Otarbaev, N.K. Pervichnye immunodeficity: (Primary immunodeficiencies) [Text]: metodicheskie recomendacii / N.K. Otarbaev, E.F. Kovzel. – [S.1], 2014. -15.
96. Primary immunodeficiency diseases associated with increased susceptibility to viral infections and malignancies [Text] / N. Rezaei, M. Hedayat, A.

Aghamohammadi, K.E. Nichols // J. Allergy Clin. Immunol. – 2011. – Vol. 127, N. 6. – P. 1329-1341.

97. Tuzakina, I.A. Analiz klinicheskih projavlenii debjutapervichnyh immunodeficitov u vzroslyh: (Analysis of clinical manifestations of primary immunodeficiencies debut in adults) [Text] / I.A. Tuzakina, M.L. Karakina, E.V. Vlasova // Med.Immunol. – 2014. –Vol. 16, N 4. – P. 367-374.
98. Tuzakina, I.A. K voprosu diagnostiki immunopatologii: (On the question of diagnostic immunopathology) [Text] / I.A. Tuzakina // Med.immunol. – 2010. – Vol. 12, N 6. – P. 485-496.
99. Ройт А. Иммунология [Текст] / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
100. Laboratory Clues to Immunodeficiency: Missed Chances for Early Diagnosis [Text] / P.D. Bright, N. Rooney, P.F. Virgo [et al.] // J. Clin. Pathol. – 2015. – Vol. 68, N 1. – P. 1-5.
101. Бедулева, Л.В. Эффективность иммунограммы в диагностике вторичных иммунодефицитов [Текст] / Л.В. Бедулева, И.В. Меньшиков // Рос. аллергол. журн. – 2008. – № 1. – Прил. 1. – С. 35-36.
102. Нестерова, И.В. Вторичные иммунодефициты: необходимость корректной диагностики и адекватной интерферono- и иммунотерапии [Текст] / И.В. Нестерова // Ремедиум. – 2009. – № 4. – С. 23-25.
103. Ильина, Н.И. Вторичные иммунодефицитные состояния (ВИДС): Протоколы диагностики и лечения [Текст] / Н.И. Ильина // Аллергия, астма и клин. иммунология. – 2000. – № 1. – С. 31-33.
104. Парахонский, А.П. Коррекция вторичных иммунодефицитных состояний при хронических гастроинтестинальных болезнях [Текст] / А.П. Парахонский, А.В. Полянский // Фундам. исслед. – 2008. – № 2. – С. 45-46.
105. Kolhir, P.V. Dokazatelnaya allergologiya-immunologiya: (Evidence allergist-immunologist) [Text] / P.V. Kolhir. – M.: Prakt.medicina, 2010. – 528 p.

106. Dominant-activating germline mutations inthe gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110δ result in T cell senescence and human immunodeficiency [Text] / C.L. Lucas, H.S. Kuehn, F. Zhao [et al.] // Nat. Immunol. – 2014. – Vol. 15, N 1. – P. 88-97.

107. Вторичные иммунодефициты [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://medlec.org/lek-178010.html. – Загл. с экрана.

108. Нестерова, И.В. Иммунотерапия и иммунотропные препараты [Текст] / И.В. Нестерова // Справочник по иммунотерапии для практического врача / И.В. Нестерова, А.А. Старченко, С.А. Иванова, А.С. Симбирцев. – СПб., 2002. – С. 88-99.

109. Лусс, Л.В. Вторичные иммунодефициты и принципы назначения иммуномодулирующей терапии [Текст] / Л.В. Лусс // Медицина. – 2005. – № 4 (11). – С. 73-76.

110. Хаитов, Р.М. Основные принципы иммуномодулирующей терапии [Текст] / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Аллергия, астма и клин. иммунология. – 2000. – № 1. – С. 9-16.

111. Решетникова, Л.К. Клиническая иммунология [Текст]: учеб. пособие / Л.К. Решетникова. – Благовещенск: АГМА, 2005. – 132 с.

112. Андронова, Т.М. Ликопид (ГМПД) – современный отечественный высокоэффективный иммуномодулятор [Текст] / Т.М. Андронова, Б.В. Пинегин, И.Г. Козлов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М.: [б. и.], 2008. – 24 с.

113. Латышева, Т.В. Вторичные иммунодефициты: Возможности использования отечественного иммуномодулятора Галавит [Текст] / Т.В. Латышева, Н.Х. Сетдикова, К.С. Манько // Цитокины и воспаление – 2005. – № 3. – С. 95-99.

114. Справочник лекарственных средств, которые метаболизируются в организме человека [Текст] / под ред. акад. В.Г. Кукеса. – М.: МАКФиФ, 2013 – 162 с.

115. Исмаилов, И.З. Разработка и применение иммуномодуляторов на современном этапе: проблемы и перспективы [Текст] / И.З. Исмаилов, А.З. Зурдинов, Т.С. Сабирова // Науч. журн. – 2017. – № 1 (14). – С. 83-87.
116. Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2013 [Text]. – 16th ed. – Oslo: [s. n.], 2012. – 284 c.
117. Павленко, В.И. Диагностика и лечение иммунодефицитных состояний [Текст]: учеб. пособие / В.И. Павленко. – Благовещенск: [б. и.], 2017. – 232 с.
118. Лебедев, К.А. Иммунная недостаточность [Текст] / К.А. Лебедев, И.Д. Понякина. – М.: Мед. книга, 2003. – 240 с.
119. Spickett, G. Oxford handbook of clinical immunologe and allergy [Text] / G. Spickett. – Oxford : University Press, 2006. – 627 p.
120. Oral purified bacterial extracts in chronic bronchitis and COPD: systematic review [Text] / C. Steurer-Stey, L.M. Bachmann, J. Steurer et al. // Chest. – 2004. – Vol. 126. – P. 1645-1655.
121. Naturally occurring immune response against bacteria commonly involved in upper respiratory tract infections: analysis of the antigen-specific salivary IgA levels [Text] / G.A. Rossi, C. Peri, M.E. Raynal[et al.] // Immunol. Lett. – 2003. – Vol. 86, N 1. – P. 85-91.
122. Administration of a polyvalent mechanical bacterial lysate to elderly patients with COPD: Effects on circulating T, B and NK cells [Text] / G. Lanzilli, E. Traggiai, F. Braido [et al.] // Immunol. Lett. – 2013. – Vol. 149, N 1/2. – P. 62-67.
123. In vitro effects of an immunostimulating bacterial lysate on human lymphocyte function [Text] / G. Lanzilli, R. Falchetti, M. Tricarico [et al.] // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. – 2005. – Vol. 18, N 2. – P. 245-254.
124. In vivo effect of an immunostimulating bacterial lysate on human B-lymphocytes [Text] / G. Lanzilli, R. Falchetti, A. Cottarelli [et al.] // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. – 2006. – Vol. 19, N 3. – P. 551-559.

125. Immune modulator pidotimod decreases the in vitro expression of CD30 in peripheral blood mononuclear cells of atopic asthmatic and normal children [Text] / D. Gourgiotis, N.G. Papadopoulos, A. Bossios [et al.] // J. Asthma. – 2004. – Vol. 41, N 3. – P. 285-287.

126. Gardulf, A. Replacement IgG therapy and self-therapy at home improve the health-related quality of life in patients with primary antibody deficiencies [Text] / A. Gardulf, U. Nicolay // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. – 2006. – Vol. 6, N 6. – P. 434-442.

127. Shi, L. Isolation, purification, and immunomodulatory activity in vitro of hree polysaccharides from roots of Cudrania tricuspidata [Text] / L. Shi // Acta Biochim. Biophys. Sin. – 2011. – Vol. 43, iss. 5. – P. 418-424.

128. Чернушенко, Е.Ф. Иммунокорригирующая терапия [Текст] / Е.Ф. Чернушенко // Журн. практ. лекаря. – 2001. – № 1. – С. 24-27.

129. Орёл, А.А. Обзор российского рынка иммуномодуляторов [Текст] / А.А. Орёл // Смолен. мед. альм. – 2016. – № 1. – С. 174-177.

130. Новиков, Д. К. Клиническая иммунопатология [Текст]: рук. / Д.К. Новиков, П.Д. Новиков. – М.: Мед. лит., 2009. – 448 с.

131. The administration of a polyvalent mechanical bacterial lysate in elderly patients with COPD results in serological signs of an efficient immune response associated with a reduced number of acute episodes [Text] / R. Ricci, C. Palmero, G. Bazurro [et al.] // Pulm. Pharmacol. Ther. – 2014. – Vol. 27, N 1. – P. 109-113.

132. A mixture of bacterial mechanical lysates is more efficient than single strain lysate and of bacterial-derived soluble products for the induction of an activating phenotype in human dendritic cells [Text] / B. Morandi, A. Agazzi, A. D'Agostino [et al.] // Immunol. Lett. – 2011. – Vol. 138, N 1. – P. 86-91.

133. Immunostimulants for preventing respiratory tract infection in children [Text] / B.E. Del-Rio-Navarro, F. Espinosa Rosales, V. Flenady, J.J. Sienra-Monge // Cochrane Database Syst. Rev. – 2006. – Vol. 4. CD004974.

134. Cazzola, M. L. Polyvalent mechanical bacterial lysate for the prevention of recurrent respiratory infections: a meta-analysis [Text] / M.L. Cazzola, S. Anapurapu, C.P. Page // Pulm. Pharmacol. Ther. – 2012. – Vol. 25, N 1. – P. 62-68.
135. Cazzola, M. Value of adding a polyvalent mechanical bacterial lysate to therapy of COPD patients under regular treatment with salmeterol/fluticasone [Text] / M. Cazzola, P. Noschese, F. Di Perna // Ther. Adv. Respir. Dis. – 2009. – Vol. 3, N 2. – P. 59-63.
136. Арутюнов, А.Г. Место бактериальных лизатов в терапии рецидивирующих бактериальных инфекций [Текст] / А.Г. Арутюнов, Д.О. Драгунов, А.В. Соколова // Рус. мед. журн. – 2014. – № 31. – С. 2176-2180.
137. Хаитов, Р.М. Значение функциональной активности толл-подобных рецепторов и других рецепторов врожденной иммунной системы в физиологии почек [Текст] / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, М.В. Пащенков // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2007. – Т. 93, № 5. – С. 505-520.
138. Sublingual therapeutic immunization with a polyvalent bacterial preparation in patients with recurrent respiratory infections: immunomodulatory effect on antigen-specific memory CD4+ T cells and impact on clinical outcome [Text] / D. Alecsandru, L. Valor, S. Sanchez-Ramon [et al.] // Clin. Exp. Immunol. - 2011. – Vol. 164, N 1. – P. 100-107.
139. Meta-analysis of published clinical trials of a ribosomal vaccine in prevention of respiratory infections [Text] / P. Boyle, J.A. Bellanti, C. Robertson et al. // BioDrugs. – 2000. – Vol. 14, N 6. – P. 389-408.
140. Vaccines for preventing pneumococcal infection in adults [Text] / S. Moberley, J. Holden, D.P. Tatham, R.M. Andrews // Cochrane Database Syst. Rev. – 2013. – Vol. 1. – CD000422.
141. Антонова, Л.П. Эффективность вакцинотерапии в лечении больных бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких

[Текст]: автореф. дис. … канд. мед. наук / Л.П. Антонова. – М., 2008. – 25 с.

142. Андронова, Т.М. Ликопид (ГМПД) – современный отечественный высокоэффективный иммуномодулятор [Текст] / Т.М. Андронова, Б.В. Пинегин, И.Г. Козлов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М.: [б. и.], 2008. – 24 с.
143. Schaad, U.B. OM-85 BV, an immunostimulant in pediatric recurrent respiratory tract infections: a systematic review [Text] / U.B. Schaad // World J. Pediatr. – 2010. – Vol. 6, N 1. – P. 5-12.
144. Княжеская, Н.П. Бактериальные лизаты (Бронхо-Ваксом) в лечении и профилактике респираторных аллергических заболеваний [Текст] / Н.П. Княжеская // Эффективная фармакотерапия. Аллергология и иммунология. – 2014. – № 3 (44). – С. 20-23.
145. Княжеская, Н.П. Бронхо-Ваксом в лечении пациентов с аллергическими заболеваниями респираторного тракта [Текст] / Н.П. Княжеская // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2013. – № 3. – С. 35-39.
146. Маркова, Т.П. Бактериальные иммуномодуляторы [Текст] / Т.П. Маркова, Д.Г. Чувиров // Рус. мед. журн. – 2001. – Т. 9, № 16/17. – С. 703-706.
147. Зайков, С.В. Перспективы применения бактериальных лизатов при заболеваниях органов дыхания (обзор литературы) [Текст] / С.В. Зайков // Укр. пульмонол. журн. – 2009. – № 3. – С. 64-68.
148. Княжеская, Н.П. Место бактериальных лизатов в лечении респираторных заболеваний [Текст] / Н.П. Княжеская // Мед. совет. – 2013. – № 3. – С. 28-33.
149. Маркова, Т.П. Бактериальные лизаты. Бронхо-Ваксом. [Текст] / Т.П. Маркова, Д.Г. Чувиров // Рус. мед. журн. – 2006. – Т. 14, № 22. – С. 1612-1615.

150. Кубылинская, И.А. Применение Бронхо-Ваксома в профилактике и лечении острых и хронических заболеваний ЛОР- органов у детей [Текст] / И.А. Кубылинская // Фармацевт. вестн. – 2006. – № 15. – С. 26.

151. De Benedetto, F. Prevention of respiratory tract infections with bacterial lysate OM-85 bronchomunal in children and adults: a state of the art [Text] / F. de Benedetto, G. Sevieri // Multidiscip. Respir. Med. – 2013. – Vol. 8, N 1. – P. 33.

152. Богомильский, М.Р., Бактериальный иммунокорректор бронхомунал в профилактике патологии ЛОР-органов в группе часто болеющих детей [Текст] / М.Р. Богомильский, Т.И. Гаращенко, Т.Л. Маркова // Актуальные вопросы оториноларингологии детского возраста и фармакотерапии ЛОР-органов. – М., 2001. – С. 171-182.

153. Th1 polarizing capacity of clinical grade dendritic cells triggered by Ribomunyl but is compromised by PGE2 [Text] / W. Jongmans, D.M. Tiemessen, I.J. van Vlodrop [et al.] // J. Immunother. – 2005. – Vol. 28, N 5. – C. 480-487.

154. Identification of a clinical grade maturation factor for dendritic cells [Text] / C. Boccaccio, S. Jacod, A. Kaiser [el al.] // J. Immunother. – 2002. – Vol. 25, N.1. – P. 88-96.

155. Чучалин, А.Г., Вакцинопрофилактика болезней органов дыхания в рамках первичной медико-санитарной помощи населению [Текст] / А.Г.Чучалин, Т.Н.Биличенко, Г.Л.Осипова, Е.А.Курбатова, Н.Б.Егорова, М.П.Костинов // Пульманология. –М., 2015. –С 14-16.

156. Efficacv and tolerability of Immucytal® in the prevention and treatment of res piratory tract infectuins: a randomized, placebo controlled, double blind study [Text] / G.B. Galioto, P. Galioto, E. Mevio [et al.] // Int. J. Immunother. – 2001. – Vol. 17, N 1. – P. 31-40.

157. Gramiccioni E. Efflicacy and tolera bilily of Immucytal® in the prevention of upper respiratory tract infections: a randomized, placebo controlled, double

blind study [Text] / E. Gramiccioni, G. Girbino, D. Pelucco // J. Clin. Res. – 2001. – N. 4. – P. 53–63.

158. Опыт применения препарата ИРС19 в лечении острых респираторных заболеваний верхних дыхательных путей у детей [Текст] / М.Р. Богомильский, Т.И. Гаращенко, Е.Ю. Радциг [и др.] // Детский доктор. – 2000. – № 2. – С. 10-13.

159. Маркова, Т.П. Применение и механизм действия ИРС 19® в группе длительно и часто болеющих детей [Текст] / Т.П. Маркова, Д.Г. Чувиров, Т.И. Гаращенко // Иммунология. – 2000. – № 5. – С. 56-58

160. Оценка эффективности препарата ИРС19 при лечении острых инфекций верхних дыхательных путей у детей [Текст] / Н.И. Шмелева, М.В. Леонова, О.В. Ефременкова, Ю.Б. Белоусов // Дет.доктор. – 2000. – № 6. – С. 16-18.

161. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств: (формулярная система) [Текст] / под ред. А.Г. Чучалина, Ю.Б. Белоусова, В.В. Ясенцева. – М.: Эхо, 2011. – Вып. 12. – 938 с.

162. Дмитриев, Ю.Я. Применение нуклеината натрия на фоне полихимиотерапии [Текст] / Ю.Я. Дмитриев, И.Н. Павлова, С.П. Воронин // Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии: тез. докл. 5 конгр. – М., 2002. – С. 144.

163. Конопацкова, О.М. Применение нуклеината натрия у больных раком молочной железы в процессе химиотерапии [Текст] / О.М. Конопацкова, И.Н. Павлова // Применение высоких технологий в диагностике и лечении рака молочной железы: материалы Рос. науч.-практ. конф. – М., 2006. – С. 74-75.

164. Павлова, И.Н. Применение нуклеината натрия для лечения больных раком молочной железы на фоне полихимиотерапии [Текст] / И.Н. Павлова, О.М. Конопацкова. – Рацпредложение № 2800 от 28.04.2009.

165. Сравнительное действие тималина, тимогена и ронколейкина на состояние иммунитета и гемостаза при развитии эндометрита после

кесарева сечения [Текст] / Л.И. Анохова, А.В. Патеюк, Б.И. Кузник, Э.Д. Загородняя // Сиб. мед. журн. – 2012. – Т. 108, №1. – С. 48-51.

166. Сравнительное действие тималина, эпиталамина и вилона на состояние иммунитета у больных с осложненным течением острого аппендицита [Текст] / Б.И. Кузник, Х.Р. Абдулаев, Ю.А. Витковский [и др.] // Мед. иммунология. – 2008. – Т. 10, № 4/5. – С. 455-462.

167. Полиоксидоний – иммуномодулятор последнего поколения: итоги трехлетнего клинического применения [Текст] / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, А.В. Некрасов А.В. [и др.] //Аллергия, астма и клин. иммунология. – 1999. – № 3. – С. 3-6.

168. Пинегин, Б.В. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения [Текст] / Б.В. Пинегин, А.В. Некрасов, Р.М. Хаитов // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 3. – С. 41-47.

169. Кунгуров, Н.В. Иммуномодулятор полиоксидоний в терапии больных псориатической болезнью [Текст] / Н.В. Кунгуров. – М.: Медицина, 2004. – 250 с.

170. Минеев, В.Н. Иммунокоррекция полиоксидонием в профилактике гриппа и ОРВИ [Текст] / В. Н. Минеев // Новые С.-Петерб. врачеб. ведомости. – 2006. – № 1. – С. 91-93.

171. Влияние полиоксидония на уровень антителообразования к возбудителям флегмон челюстно-лицевой области и эффективность санации гнойных очагов у пациентов с разными типами реактивности [Текст] / М. Н. Порфиридиас [и др.] // Стоматолог. – 2008. – № 11. – С. 50-57.

172. Полиоксидоний в онкологической практике [Текст] / Е.В. Артамонова, Л.В. Маназюк, О.В. Короткова [и др.] // Человек и лекарство: сб. материалов симп. – М., 2002. – С. 29.

173. Влияние иммуномодулятора Полиоксидоний на качество жизни больных раком молочной железы [Текст] / Л.Е. Комарова, Л.В. Манзюк,

Е.В. Артамонова [и др.] // Материалы VI Всерос. съезда онкологов. – М., 2005. – Т. 2. – С. 334–335.

174. Яременко, К.В. Адаптогены в фитотерапии [Текст] / К.В. Яременко // 1-й Рос. фитотерапевт. съезд: сб. науч. тр. – М., 2008. – С. 363-364.

175. Механизмы иммунотропного влияния экстракта корней алтея [Текст] / О.С. Борсук, Н.В. Масная, Е.Ю. Шерстобоев [и др.] // Вестн. Урал. мед. акад. наук. – 2009. – № 2/1. – С. 199-200.

176. Практическая фитотерапия [Текст] / Т.А. Виноградова, Б.Н. Гажёв, В.М. Виноградов, В.К. Мартынов; под ред. Б.Н. Гажёва. – М.: Олма-Пресс; СПб.: Нева: Валери СПД, 1998. – 640 с.

177. Данилец, М.Г. Влияние полисахаридов из растительного сырья на Thl-зависимый иммунный ответ (скрининговое исследование) [Текст] / М.Г. Данилец, Ю.П. Вельский, А.М. Гурьев [и др.] // Эксперим. и клин. фармакология. – 2010. – Т. 73, № 6. – С. 19-22.

178. Денисенко, О.Н. Разработка фитопрепарата для повышения неспецифической резистентности и иммунокоррекции организма [Текст] / О.Н. Денисенко, Л.В. Челова, А.В. Харченко // Тез. докл X Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство». – М., 2001. – С. 269.

179. Иммуностимулирующая активность тритерпенов растительного происхождения и их производных [Текст] / Г.А. Толстиков, Т.Н. Ильичева, А.Г. Покровский [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2001. – № 2. – С. 53-56.

180. Исайкина, Н.В. Исследование иммунотропной активности растительного экстракта «Эхиносол» [Текст] / Н.В. Исайкина, Т.В. Перевозчикова, Г.И. Калинкина // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 8. – С. 188-191.

181. Конопля, А.И. Использование лекарственных препаратов растительного происхождения в качестве иммуномодуляторов [Текст] / А.И. Конопля, Г.А. Дрозд, Н.Н. Кедровская // Фармация. – 1988. – № 2. – С. 17-19.

182. Корсун, В.Ф. Клиническая фитотерапия в онкологии [Текст] / В.Ф. Корсун. – Мн.: Белорус. наука, 2003. – 365 с.

183. Монографии ВОЗ о лекарственных растениях, широко используемых в Новых независимых государствах (ННГ) [Электронный ресурс]. – Женева: ВОЗ, 2010. – 240 с. – Режим доступа: http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js17534ru/. – Загл. с экрана.

184. Кривошеева, Е.М. Спектр фармакологической активности растительных адаптогенов [Текст] / Е.М. Кривошеева, Е.В. Фефелова, С.Т. Кохан // Фундам. исслед. – 2011. – № 6. – С. 85-88.

185. Растения, стимулирующие иммунитет [Текст] / Д.Н. Лазарева, В.В. Плечев, Т.В. Моругова, Л.И. Самигуллина. – Уфа: [б. и.], 2005. – 96 с.

186. Малышко, М.А. Фитотерапия в современной жизни Минска [Текст] / М.А. Малышко, Е.В. Корсун // Современные проблемы фитотерапии и травничества: материалы 3-го Междунар. съезда фитотерапевтов и травников. – М., 2013. – С. 169-174.

187. Вавилова, В.П. Рецидивирующие острые респираторные инфекции у детей: эффективность и безопасность фитотерапии [Текст] / В.П. Вавилова, Т.А. Вавилова, А.Х. Черкаева // Педиатр. фармакология. – 2015. – Т. 12, № 5. – С. 605-608.

188. Николаева, И.Г. Разработка и стандартизация средств растительного происхождения, обладающих адаптогенной активностью [Текст]: автореф. дис. … д-ра фармацевт. наук / И.Г. Николаева. – Улан-Удэ, 2012. – 48 с.

189. Новые фитопрепараты из растений Дальнего Востока [Текст] / Т.А. Степанова, С.В. Степанов, О.В. Стусенко [и др.] // Международная науч. конф. "Азиатско-тихоокеанский регион в глобальной политике, экономике и культуре XXI века", Хабаровск, 22-23 окт. 2002 г.: материалы конф. – Хабаровск, 2002. – Т. 4. – С. 96-101.

190. Современные аспекты фитотерапии [Текст] / А.В. Щулькин, И.В. Черных, Н.М. Попова, Е.Н. Якушева // Фармация. – 2016. – № 6. – С. 3-6.

191. WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems [Электронный ресурс]. – Geneva: WHO, 2004. – Режим доступа: http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s7148e/s7148e.pdf. – Загл. с экрана.

192. WHO. Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review [Электронный ресурс]. – Geneva: World Health Organization, 1998. – 49 p. – Режим доступа: www.who.int/medicinedocs/pdf/.../whozip57e.pdf. – Загл. с экрана.

193. Innovation in phytotherapy: is a new regulation the feasible perspective in Europe? [Text] / P. Minghetti, S. Franze, V. Zaccara [et al.] // Planta Med. – 2016. – Vol. 82, N 7. – P. 591-595.

194. Newman, D.J. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 [Text] / D.J. Newman, G.M. Cragg // J. Nat. Prod. – 2016. – Vol. 79, N 3. – P. 629-661.

195. WHO monographs on selected medicinal plants [Электронный ресурс]. – Geneva: WHO, 1999. – Vol. 1. – 295 p. – Режим доступа: http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2200e/s2200e.pdf. – Загл. с экрана.

196. WHO monographs on selected medicinal plants [Электронный ресурс]. – Geneva: WHO, 2004. – Vol. 2. – 358 p. – Режим доступа: http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4927e/s4927e.pdf. – Загл. с экрана.

197. WHO monographs on selected medicinal plants [Электронный ресурс]. – Geneva: WHO, 2007. – Vol. 3. – 390 p. – Режим доступа: http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14213e/s14213e.pdf. – Загл. с экрана.

198. WHO monographs on selected medicinal plants [Электронный ресурс]. – Geneva: WHO, 2009. – Vol. 4 – 456 p. – Режим доступа: http://www.who.int/medicines/areas/traditional/SelectMonoVol4.pdf. – Загл. с экрана.

199. WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS) [Электронный ресурс]. – Geneva: WHO, 2010. – Режим доступа: http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s17534en/s17534en.pdf. – Загл. с экрана.

200. Гринкевич, Н.И. Лекарственные растения [Текст] / Н.И. Гринкевич. – М.: Высш. шк., 1991. – 400 с.

201. Дардымов, И.В. Механизмы действия препаратов женьшеня и элеутерококка [Текст]: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / И.В. Дардымов. – Л., 1987. – 41 с.

202. Дремова, Е.А. Особенности фитохимического и фармакологического исследования экдистероидов, выделенных из корневищ с корнями левзеи сафлоровидной [Текст] / Е.А. Дремова // Межвузовская конф. молодых ученых «Аспирантские чтения-2006». – Самара, 2006. – С. 239-242.

203. Рыльков, М.И. Практическая фитотерапия [Текст] / М.И. Рыльков, А.П. Щекотова, М.А. Гоголева. – Пермь: [б. и.], 1993. – 422 с.

204. Саратиков, А.С. Родиола розовая (золотой корень) [Текст] / А.С. Саратиков, Е.А. Краснов. – 4-е изд., перераб. и доп. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. – 292 с.

205. Виноградов, В.М. Семейство толстянковые [Текст] / В.М. Виноградов // Жизнь растений. – М., 1981. – Т. 5, ч.2. – 511 с.

206. Астафьев, М.В. Родиола розовая – источник иммуномодулирующих лекарственных средств [Текст] / М.В. Астафьев // Вестн. Самар. гос. пед. ун-та. – 2008. – № 6-1. – С. 10-14.

207. Флора Киргизской ССР. Определитель растений Киргизской ССР [Текст]. – Фрунзе: Изд-во АН КиргССР, 1957. – Т. 7. – 643 с.

208. Galambosi, B. Rhodiola rosea L. from wild collection to field production [Text] / B. Galambosi // Medicinal Plant Conservation. – 2005. – Vol. 11, № 1. – P. 31-35.

209. Чалданбаева, А.К. Химическое излучение и возможности использования в медицине ряда растений рода Rhodiola флоры Кыргызстана [Текст] / К. Чалданбаева, Ж.С. Нуралиева // Вестн. Кырг. гос. мед. акад. им. И.К. Ахунбаева. – 2012. – № 4. – С. 121-123.

210. Саратиков, А.С. Растительные психостимуляторы-адаптогены [Текст] / А.С. Саратиков, Е.А. Краснов // Фундаментальные науки – медицине (реалии, приоритеты, перспективы). – Красноярск, 1998. – С. 366-381.

211. Куркин, В.А. Родиола розовая: комплексная переработка сырья [Текст] / В.А. Куркин // Фармация. – 2006. – № 1. – С.40-42.

212. Куркин, В.А. Родиола розовая (золотой корень): стандартизация и создание лекарственных препаратов [Текст]: моногр. / В.А. Куркин. – Самара: Офорт; ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, 2015. – 240 с.

213. Дементьева, Л.А. Изучение влияния экстракта золотого корня на рост опухоли в эксперименте [Текст] / Л.А. Дементьева, К.В. Яременко // Бюл. Сиб. отд-ния Акад. мед. наук СССР. – 1983. – № 6. – С. 77-79.

214. Краснов, Е.А. Химическое изучение растений и возможности использования в медицине ряда растений семейства толстянковых флоры СССР [Текст]: автореф. дис. ... д-ра фармацевт. наук / Е.А. Краснов. – М., 1990. – 46 с.

215. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия [Текст] / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, 2002. – 656 с.

216. Оценка качества масла семян лимонника китайского и возможность создания на его основе таблетированных лекарственных форм [Текст] / Ю.А. Морозов, М.С. Макиева, М.Ф. Правдюк [и др.] // Фундам. исслед. – 2014. – № 9 (2). – С. 365-369.

217. Путырский, И.Н. Универсальная энциклопедия лекарственных растений [Текст] / И.Н. Путырский, В.Н. Прохоров. – Мн.: Книж. дом; М.: Махаон, 2000. – 605 с.

218. Light-mediated antifungal activity of echinacea extracts [Text] / S.F. Binns, B. Purgina, C. Bergeron [et al.] // Planta Medica. – 2000. – Vol. 66, N 3. – P. 241-244.

219. Miller, S.C. Echinacea: a Miracle Herb against Aging and Cancer? Evidence In vivo in Mice [Text] / S.C. Miller // CAM. – 2005. – Vol. 2, N 3. – P. 309-314.

220. Barrett, B. Echinacea for upper respiratory infection [Text] / B. Barrett, M. Vohmann, C. Calabrese // J. Fam. Pract. – 1999. – Vol. 48, N 8. – P. 628-635.

221. Echinacea for preventing and treating the common cold [Text] / K. Linde, B. Barrett, K. Wolkart [et al.] // Cochrane Database Syst. Rev. – 2006. – N 1. – CD000530.

222. Huntley, A.L. The safety of herbal medicinal products derived from Echinacea species: a systematic review [Text] / A.L. Huntley, C.J. Thompson, E. Ernst // Drug Saf. – 2005. – Vol. 28, N 5. – P. 387-400.

223. Безуглая, Е.П. Методологический подход к фармацевтической разработке / Е.П. Безуглая, Н.А. Ляпунов, В.А. Бовтенко // Промышл. обозрение. – 2008. – № 6 (11). – С. 36-41.

224. Кондрахина, О.С. Методические подходы к формированию оптимального ассортимента лекарственных препаратов [Текст] / О.С. Кондрахина, Г.Т. Глембоцкая // Фармация. – 1994. – № 2. – С. 53-54.

225. Государственная фармакопея СССР [Текст]. – 10-е изд. – М.: Медицина,1968. – 1080 с.

226. Государственная фармакопея СССР [Текст] / М.Д. Машковский, Э.А. Бабаян, А.Н. Обоймакова и др. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина,1989. – Вып. 2. – 397 с.

227. European Pharmacopoeia 6.0 [Text]. – [S. l.]: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2007-2010. – Vol. 1. – 1129 p.; Vol. 2. – 2240 p.

228. Томпсон, М. Руководство по спектрометрическому анализу с индуктивно-связанной плазмой [Текст] / М. Томпсон, Д.Н. Уолш. – М.: Недра, 1988. – 288 с.

229. Галева, Э.И. Возможности атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой [Текст] / Э.И. Галева, К.В. Холин, Е.С. Нефедьев // Вестн. Казан. технол. ун-та. – 2013. – Т. 16, № 9. – С. 63-64.

230. Практикум по химии углеводов [Текст] / под ред. Ю.А. Жданова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1973. – 204 с.

231. Государственная Фармакопея Российской Федерации [Текст]. – 12-е изд. – М.: НЦЭСМП, 2008-2010. – Ч. 1. – 2008. – 704 с.; Ч. 2. – 2010. – 600 с.

232. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP) [Текст]. – М.: [б. и.], 1992. – 78 с.

233. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Текст] / под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с.

234. OECD Guideline for the Testing of Chemicals N 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test [Электронный ресурс]. – 2016. – 29 p. – Режим доступа: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test_9789264264861-en. – Загл. с экрана.

235. SFTG International collaborative study on the in vitro micronucleus test using L5178Y cells [Text] / J. Oliver, J.-R. Meunier, T. Awogi [et al.] // Mutation Res. – 2006. – Vol. 607. – P. 125-152.

236. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам [Текст]: клин. рек. // XVI Междунар. конгр. по антимикроб. химиотерапии МАКМАХ/ESCMID, 21-23 мая 2014. – М., 2014. – 154 с.

237. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages [Text] / S. Hougee, A. Sanders, J. Faber [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 2005. – Vol. 69, N 2. – P. 241-248.

238. Blois, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical [Text] / M.S. Blois // Nature. – 1958. – Vol. 26. – P. 1198-1200.

239. Roginsky, V. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food [Text] / V. Roginsky // Food Chem. – 2005. – Vol. 92, N 2. – P. 235-254.

240. Hager, T.J. Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry

products [Text] / T.J. Hager // J. Agric. and Food Chem. – 2008. – Vol. 56, № 3. – P. 689-695.

241. Медицинская статистика [Текст]: учеб. пособие / под ред. К.У. Акынбекова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Бишкек: [б. и.], 2006. – 184 с.

242. Исмаилов, И.З. Анализ фармацевтического рынка иммуномодуляторов в Кыргызской Республике [Текст] / И.З. Исмаилов // Europaische Fachhochschule. – 2016. – № 7. – С. 11-16.

243. Исмаилов, И.З. Маркетинговые исследования лекарственных препаратов группы иммуномодуляторов в Кыргызской Республике [Текст] / И.З. Исмаилов // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. – 2016. – № 8, ч. 5. – С. 764-766.

244. Алексеева, И.В. Разработка состава, технологии и оценка качества фитопленок на основе сухих растительных экстрактов [Электронный ресурс] / И.В. Алексеева, К.Л. Соловьева, Т.А. Веселкова // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 5. – https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=7174. – Загл. с экрана.

245. Исмаилов, И.З. Разработка технологии получения сухого экстракта Padus Grayanae Maxim [Текст] / И.З. Исмаилов // Наука, техника и образование. – 2016. – № 10 (28). – С.100-102.

246. Исмаилов, И.З. Определение содержания флавоноидов и аскорбиновой кислоты в экстракте Padus Grayanae Maxim методом ВЭЖХ [Текст] / И.З. Исмаилов // Modern Science. – 2016. – № 9. – P. 78-80.

247. Исмаилов, И.З. Изучение биологически активных веществ Padus Grayanae Maxim и их антиоксидантные свойства [Текст] / И.З. Исмаилов // Вестн. науки и образования. – 2017. – № 4 (28). – С.105-109.

248. Исмаилов, И.З. Анализ количественного определения содержания моно-, олиго- и полисахаридов в сухом экстракте Padus Grayanae Maxim [Текст] / И.З. Исмаилов // Изв. вузов. – Бишкек, 2017. – № 7. – С. 45-47.

249. Исмаилов, И.З. О новом оригинальном фитопрепарате с иммуномодулирующей активностью [Текст] / И.З. Исмаилов // Сборник

тез. 2-го съезда Рос. науч. о-ва фармакологов «Фундаментальные проблемы фармакологии». – М., 2003. – Ч. 1. – С. 216.

250. Пат. 2038089 РФ, А 61 К 35/78. Средство, обладающее иммуномодулирующим действием [Текст] / В.И. Ткаченко, А.З. Зурдинов, М.Т. Нанаева [и др.]. – № 5009979/14; Заявл. 01.10.1991; Опубл. 27.06.1995.

251. Общая патология гипомикроэлементозов [Текст] / А.А. Жаворонков, Л.М. Михалева, Л.В. Кактурский [и др.] // Арх. патологии. – 1997. – Т. 59, № 2. – С. 8-11.

252. Бушуев, Н.Н. Тяжелые металлы в промышленном производстве и их влияние на здоровье человека [Текст] / Н.Н. Бушуев // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения: тр. 6-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, 24-26 нояб. 2011 г. – СПб., 2011. – С. 115-116.

253. СанПиН 2.3.2.1078-01. Продовольственное сырье и пищевые продукты. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов [Текст]. – М.: Минздрав России. 2002. – 74 с.

254. Исмаилов, И.З. Исследование содержания химических элементов в фитоэкстракте Padus Grayana Maxim [Текст] / И.З. Исмаилов // Междунар. журн. прикл. и фундам. исслед. – 2017. – № 7. – С. 117-120.

255. Исмаилов, И.З. Микробиологическая чистота как показатель качества сухого экстракта из надземных частей Padus Grayanae Maxim [Текст] / И.З. Исмаилов, А.А. Кравцов // Наука и образование сегодня. – 2017. – № 1 (12). – С. 94-99.

256. Белоусов, Ю.Б. Фармакологический надзор за лекарственными средствами растительного происхождения [Текст] / Ю.Б. Белоусов, К.Г. Гуревич // Фарматека. – 2004. – № 3/4. – С. 16-18.

257. Лавренев, В.К. Полный справочник целебных трав и растений [Текст] / В.К. Лавренев, Г.В. Лавренева. – СПб.: Нева, 2006. – 272 с.

258. Самылина, И.А. Проблемы безопасности лекарственных растений, содержащих эндогенные токсичные вещества [Текст] / И.А. Самылина, В.М. Булаев // Фармация. – 2009. – № 3. – С. 6-9.

259. Самылина, И.А. Лекарственные растительные сборы [Текст] / И.А. Самылина, А.А. Сорокина, Н.В. Пятигорская // Фарматека. – 2010. – № 10. – С. 80-82.

260. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) [Электронный ресурс]. – Fifth revised ed. – N.Y.; Geneva, 2013. – Режим доступа: URL:– http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_e.html. – Загл. с экрана.

261. Исмаилов, И.З. Изучение острой токсичности сухого экстракта Padus Grayanae Maxim [Текст] / И.З. Исмаилов, А.З. Зурдинов // Изв. вузов. – Бишкек, 2017. – № 7. – С. 38-40.

262. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature [Text] / N. Tajik, M. Tajik, I. Mack, P. Enck // Eur. J. Nutr. – 2017. – Vol. 56, N 7. – P. 2215-2244.

263. Acute and 4-week repeated-dose oral toxicity studies of Cirsium setidens in rats [Text] / J.S. Lee, Y.H. Kim, D.B. Kim [et al.] // Molecules. – 2014. – Vol. 19, N 6. – P. 7138-7151.

264. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных [Текст]: справ. / под ред.В.Г. Макарова, М.Н. Макаровой. – СПб.: ЛЕМА, 2013. – 116 с.

265. Трахтенберг, И.М. Проблемы нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы) [Текст] / И.М. Трахтенберг. – М.: Медицина, 1991. – 203 с.

266. Differential recovery of induced mutants at the tk and hgprt loci in mammalian cells [Text] / M.M. Moore, K.H. Brock, D.M. Demarini, C.L. Doerr // Banbury Report / eds: M.M. Moore, D.M. DeMarini, F.J. DeSerres,

K.R. Tindall; Cold Spring Harbor Laboratory. – N. Y., 1987. – N. 28: Mammalian Cell Mutagenesis. – P. 93-108.

267. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Микроядерный тест на клетках млекопитающих in vitro (OECD, Test №487: 2010, IDT). – Москва: Стандартинформ, 2015. – 16с.

268. Дурнев А.Д., Ревазова Ю.А., Верстакова О.Л. и др. Методические указания по изучению мутагенных свойств фармакологических веществ. В кн.: Хабриев Р.У., ред. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд. М.: Медицина; 2005. – С94-97.

269. Сологуб, Т.В. Иммуномодуляторы в комплексной терапии ОРВИ: возможности применения препарата Галавит [Текст] / Т.В. Сологуб, О.Ю. Осиновец // Рус. мед. журн. – 2013. – № 3. – С. 144.

270. Лусс, Л.В. Место иммуномодуляторов в педиатрической практике [Текст] / Л.В. Лусс // Педиатрия. – 2010. – № 3. – С. 73-76.

271. Tzianabos, AO. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function [Text] / A.O. Tzianabos // Clin. Microbiol. Rev. – 2000. – Vol. 13, N 4. – P. 523-533.

272. The Antiviral Response to Gamma Interferon [Text] A.P. Costa-Pereira, T.M. Williams, B. Strobl [et al.] / J. of Virology. – 2002. – Vol. 76, N 18. – P. 9060-9068.

273. Parker, B.S. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy [Text] / B.S. Parker, J. Rautela, P.J. Hertzog // Nat. Rev. Cancer. – 2016. – Vol. 16, N 3. – P. 131-144.

274. Rainsford, K.D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century [Text] / K.D. Rainsford // Subcell Biochem. – 2007. – Vol. 42. – P. 3-27.

275. Шипилов, М.В. Молекулярные механизмы “цитокинового шторма” при острых инфекционных заболеваниях [Текст] / М.В. Шипилов // Лечеб. дело. – 2012. – № 1. – С. 81-85.

276. Preventing Staphylococcus aureus Sepsis through the Inhibition of Its Agglutination in Blood [Text] / M. McAdow, H.K. Kim, A.C. DeDent [et al.]; ed. P.M. Sullam // PLoS Pathogens. – 2011. – Vol. 7, N 10. – e1002307.

277. Sepsis Induced by Staphylococcus aureus: Participation of Biomarkers in a Murine Model [Text] / T.H.C. De Oliveira, A.T. Amorin, I.S. Rezende [et al.] // Medical Science Monitor: Inter. Med. J. of Exp. and Clin. Res. – 2015. – Vol. 21. – P. 345-355.

278. The therapeutic effect of chlorogenic acid against Staphylococcus aureus infection through sortase A inhibition [Text] / L. Wang, C. Bi, H. Cai [et al.] // Front. Microbiol. – 2015. – Vol. 6. – P. 1031.

279. Goyette, R.E. Hematologic changes in sepsis and their therapeutic implications [Text] / R.E. Goyette, N.S. Key, E.W. Ely // Semin. Respir. Crit. Care Med. – 2004. – Vol. 25, N 6. – P. 645-659.

280. Effects of wogonin on the levels of cytokines and functions of leukocytes associated with NF-kappa B expression in Sprague-Dawley rats [Text] / N.Y. Tang, J.S. Yang, Y.H. Chang Y.H. [et al.] // In Vivo. – 2006. – Vol. 20, N. 4. – P. 527-532.

281. The Flavonoid Quercetin Inhibits Proinflammatory Cytokine (Tumor Necrosis Factor Alpha) Gene Expression in Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells via Modulation of the NF-κβ System [Text] / M.P. Nair, S. Mahajan, J.L. Reynolds [et al.] // Clin. Vaccine Immunol. – 2006. – Vol. 13, N. 3. – P. 319-328.

282. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties [Text] / F.M. da Cunha, D. Duma, J. Assreuy [et al.] // Free Radic. Res. – 2004. – Vol. 38, N 11. – P. 1241-1253.

283. Caffeic acid phenethyl ester modulates Helicobacter pylori-induced nuclear factor-kappa B and activator protein-1 expression in gastric epithelial cells [Text] / M.M.M. Abdel-Latif, H.J. Windle, B.S.E. Homasany [et al.] // British J. of Pharmacology. – 2005. – Vol. 146, N 8. – P. 1139-1147.

284. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity [Text] / Y.S. Song, E.H. Park, G.M. Hur [et al.] // Cancer Lett. – 2002. – Vol. 175, N 1. – P. 53-61.

285. La Flamme, A.C. Role of Gamma Interferon in the Pathogenesis of Severe Schistosomiasis in Interleukin-4-Deficient Mice [Text] / A.C. La Flamme, E.A. Patton, E.J. Pearce // Infection and Immunity. – 2001. – Vol. 69, N 12. – P. 7445-7452.

286. The role of interferon-γ in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis [Text] / C.R. Romero, D.S. Herzig, A. Etogo [et al.] // J. Leukoc Biol. – 2010. – Vol. 88, N 4. – P. 725-735.

287. Paludan, S.R. Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship [Text] / S.R. Paludan // Scand. J. Immunol. – 1998. – Vol. 48, N 5. – P. 459-468.

288. Пачкунова, М. Состояние некоторых провоспалительных цитокинов при ревматоидном артрите [Текст] / М. Пачкунова, Т. Данилова, Е. Феофанова // Врач. – 2011. – № 10. – С. 24-26.

289. The flavonoid, quercetin, differentially regulates Th-1 (IFNgamma) and Th-2 (IL4) cytokine gene expression by normal peripheral blood mononuclear cells [Text] / M.R. Nair, C. Kandaswami, S. Mahajan [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – Vol. 1593, N 1. – P. 29-36.

290. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages [Text] / S. Hougee, A. Sanders, J. Faber [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 2005. – Vol. 69, N 2. – P. 241-248.

291. Anti-inflammatory effect of resveratrol by inhibition of IL-8 production in LPS-induced THP-1 cells [Text] / Y.C. Oh, O.H. Kang, J.G. Choi [et al.] // Am. J. Chin. Med. – 2009. – Vol. 37, N. 6. – P. 1203-1214.

292. Hyperproduction of proinflammatory cytokines by WSX-1-deficient NKT cells in concanavalin A-induced hepatitis [Text] / A. Yamanaka, S. Hamano, Y. Miyazaki [et al.] // J. Immunol. – 2004. – Vol. 172, N 6. – P. 3590-3596.

293. Postal, M. The role of Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-α) in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus [Text] / M. Postal, S. Appenzeller // Cytokine. – 2011. – Vol. 56, N 3. – P. 537-543.

294. Dinarello, C.A. Proinflammatory cytokines [Text] / C.A. Dinarello // Chest. – 2000. – Vol. 118, N 2. – P. 503-508.

295. Wang, J. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor alpha in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages [Text] / J. Wang, G. Mazza // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 50, N 15. – P. 4183-4189.

296. Herath, H.M. Inhibitory effect of some flavonoids on tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage cell line J774.1 [Text] / H.M. Herath, Y. Takano-Ishikawa, K. Yamaki // J. Med. Food. – 2003. – Vol. 6, N 4. – P. 365-370.

297. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells [Text] / S.J. Hwang, Y.W. Kim, Y. Park [et al.] // Inflamm. Res. – 2014. – Vol. 63, N 1. – P. 81-90.

298. Sak, K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types [Text] / K. Sak // Pharmacogn. Rev. – 2014. – Vol. 8, N 16. – P. 122-146.

299. Tangeretin, a citrus polymethoxyflavonoid, induces apoptosis of human gastric cancer AGS cells through extrinsic and intrinsic signaling pathways [Text] / Y. Dong, A. Cao, J. Shi [et al.] // Oncol. Rep. – 2014. – Vol. 31, N 4. – P. 1788-1794.

300. Antioxidant activity and anticancer effect of ethanolic and aqueous extracts of the roots of Ficus beecheyana and their phenolic components [Электронный ресурс] / G.-C. Yen, C.-S. Chen, W.-T. Chang [et al.] // J. of Food and Drug Anal. – 2017. – Режим доступа: http://www.jfda-online.com/article/S1021-9498(17)30056-X/pdf. – Загл. с экрана.

301. Исмаилов, И.З. Изучение антиоксидантных свойств сухого экстракта Padus Grayanae Maxim [Текст] / И.З. Исмаилов, Т.С. Сабирова // Достижения науки и образования. – 2017. – № 1 (14). – С. 62-67.

302. Исмаилов, И.З. Разработка технологии получения таблеток из сухого экстракта Padus Grayanae Maxim [Текст] / И.З. Исмаилов // Наука и новые технологии. – Бишкек, 2017. – № 7. – С. 119-122.

303. Исмаилов, И.З. Технологическая разработка и стандартизация капсулированной формы сухого экстракта Padus Grayanae Maxim [Текст] / И.З. Исмаилов // Вестн. Кырг. гос. мед. акад. им. И.К. Ахунбаева. – 2017. – № 5. – С. 53-55.