

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА»

На правах рукописи

Козлов Сергей Васильевич

**НОВЫЕ МЕТОДЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ И
ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ У
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ И МЕЛКИХ НЕПРОДУКТИВНЫХ
ЖИВОТНЫХ**

06.02.01 – Диагностика болезней и терапия животных, патология,
онкология и морфология животных

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Научный консультант:

доктор ветеринарных наук,
профессор Волков А.А.

Саратов – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
I. ВВЕДЕНИЕ	5
II. ОБЗОР ЛИТЕАТУРЫ	14
2.1 Анализ заболеваемости, этиология и патогенез патологий печени у животных	14
2.2 Лекарственные средства, применяемые для коррекции патологических состояний печени у животных	39
2.3 Препараты на основе экстрактов плодов расторопши пятнистой и их гепатопротекторные свойства	51
2.4 Повышение биодоступности и терапевтической эффективности лекарственных средств	55
2.4.1 Создание мицелярных растворов липофильных лекарственных средств	55
2.4.2 Применение наночастиц в качестве носителей лекарственных веществ	60
2.5 Биологически активные вещества в терапии патологических состояний печени у животных.	67
III. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	83
3.1 Методология, материал и методы исследования	83
3.2 Результаты исследований и их анализ	103
3.2.1 Технология получения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц	103
3.2.2 Физико-химические свойства препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц	105
3.2.3 Общетоксические свойства препаратов силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц	112
3.2.4 Безопасность применения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на наличие побочных действий при различных путях введения лабораторным и целевым животным	164
3.2.5. Специфическая гепатопротекторная активность препаратов на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в экспериментах на изолированных гепатоцитах (in vitro) и лабораторных животных (in vivo)	179
3.2.5.1 Специфическая гепатопротекторная активность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и	180

полимерных матриц в экспериментах на культуре изолированных гепатоцитов (in vitro) печени крыс	
3.2.5.2 Терапевтическая эффективность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц при индуцированном тетрахлорметаном экспериментальном гепатите у мышей	185
3.2.6 Терапевтическая эффективность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в общей схеме лечения животных с заболеваниями печени	201
3.2.6.1 Терапевтическая эффективность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц при жировой дистрофии печени у коров	201
3.2.6.2 Терапевтическая эффективность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц при лечении собак с острым вторичным гепатитом	215
3.2.6.3 Терапевтическая эффективность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц при токсической дистрофии у поросят	236
3.2.7 Комплекс лечебно-профилактических мероприятий патологий гепатобилиарной системы у животных с применением разработанных препаратов, а также препаратов, стимулирующих процесс регенерации и витаминных кормовых добавок	249
3.2.7.1 Безопасность применения витаминно-минеральной кормовой добавки пороссятам отъемного периода	252
3.2.7.2 Безопасность применения водно-дисперсионного раствора метилурацила «Иммуносейв» пороссятам отъемного периода	256
3.2.7.3 Влияние препарата «Иммуносейв» на физиологические показатели телят молочного периода	264
3.2.7.4 Комплексная схема лечения поросят при токсической дистрофии печени	269
3.2.7.5 Комплекс профилактических мероприятий патологий гепатобилиарной системы у животных с применением разработанных препаратов, а также препаратов, стимулирующих процесс регенерации и витаминных кормовых добавок	272
3.2.8 Экономическая эффективность применения комплексной схемы, включающей препарат силимарина конъюгированный с наночастицами селена, мицеллярный раствор метилурацила и витаминную кормовую добавку «Волстар» в свиноводстве	275
IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	278

V.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	290
VI.	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	295
VII.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	296
VIII.	ПРИЛОЖЕНИЯ	336

I. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Интенсивный уровень развития нашего общества и происходящие изменения в его социально-экономическом развитии выдвигают на первый план проблемы аграрного сектора страны, в частности – обеспечение продовольственной безопасности государства. Обеспечение населения продуктами питания животного происхождения отечественного производства является одним из основных пунктов, продовольственной безопасности нашей страны, который напрямую зависит от здоровья животных. По статистическим данным последних лет наибольшую долю от всех патологий домашних животных составляют заболевания незаразной этиологии (Ш.М. Абдулаев, 1985, Ю.Н. Алёхин, 2011, А.В. Жаров, Ю.П. Жарова, 2012). Это объясняется негативным воздействием промышленных и природных токсинов, лекарственных средств, вирусов, бактерий, простейших, гельминтов. Так же следует отметить роль в развитие незаразной патологии нерационального содержания животных к которому можно отнести неудовлетворительные условия содержания, несбалансированность рациона животных по питательным веществам, макро-, микроэлементам и витаминам. Анализируя работы, проводимые в данном направлении можно отметить, что под влиянием вышеперечисленных факторов поражается прежде всего гепатобилиарная система (Р.А. Мерзленко, 2012, 2013, И. И. Калюжный, Н. Д. Баринов, 2013, Н.И. Кузнецов, 1990, 1998, Е.В. Кузьминова, 2006). И экономический ущерб, наносимый гепатопатиями складывается из снижения молочной продуктивности коров (на 15-26 %), уменьшения прироста живой массы (на 10-15 %), выбраковки каждой 8-10-й печени, ухудшения качества мяса.

По данным статистики, патологии печени занимают до 25% от всех незаразных болезней животных. (И.Ф. Хазимухаметова, 2009, Б.В. Уша и др., 2011, Н.А. Фердман, 2007, С.Н. Жерлицын, 2016, Н.Б. Демина, 2007, В.И. Десятник и др. 2000, В.В. Емельянов, И.З. Севрюк, 2005, А.В. Жаров, В.Д. Илеиш,

1996). Однако несмотря на такой высокий процент выявления данной патологии, к сожалению, практикующие ветеринарные врачи нередко сталкиваются с проблемой отсутствия эффективных и при этом доступных по цене ветеринарных гепатопротекторных препаратов.

К наиболее перспективным препаратам, отвечающим требованиям современной гепатологии можно отнести флавоноиды, выделяемые из лекарственного растения расторопши пятнистой, поскольку они обладают гепатопротекторным, противовоспалительным, иммуномодулирующим и антиканцерогенным действием. (V. Kren, D. Walterova, 2005, Е.В. Луценко, 2008, И.Г. Никитин, 2007).

Так как, поиск перспективных методов фармакологической коррекции поражений печени с использованием инновационных лекарственных средств является весьма актуальной проблемой. То предмет наших исследований стала разработка и внедрение в ветеринарную практику эффективных и доступных по цене ветеринарных гепатопротекторных препаратов, а также разработка на их основе схем лечения.

Цель исследования. Разработка комплекса лечебно-профилактических мероприятий при патологиях гепатобилиарной системы у животных с использованием новых лекарственных гепатопротекторных препаратов силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц (мицелл).

Задачи исследования

1. Разработать комплекс лечебно-профилактических мероприятий при патологии животных у животных с применением новых лекарственных форм силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц, а также препаратов, стимулирующих процесс регенерации и витаминных кормовых добавок;

2. Разработать и стандартизировать новые лекарственные препараты силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц (мицел);

3. Изучить физико-химические, биодинамические и фармако-токсикологические свойства новых лекарственных препаратов силимарина;

4. Дать сравнительную оценку гепатопротекторной активности новых лекарственных препаратов силимарина в экспериментах на изолированных гепатоцитах (*in vitro*) и лабораторных животных (*in vivo*);

5. Изучить характер морфологических изменений, возникающих в ткани печени под воздействием разработанных новых лекарственных препаратов силимарина;

6. Изучить специфическую гепатопротекторную активность новых лекарственных препаратов силимарина при патологии печени у крупного рогатого скота;

7. Изучить специфическую гепатопротекторную активность новых лекарственных препаратов силимарина при патологии печени у молодняка свиней;

8. Изучить специфическую гепатопротекторную активность новых лекарственных препаратов силимарина при патологии печени у плотоядных (собак).

Научная новизна

Впервые разработаны и стандартизированы новые лекарственные препараты силимарина на основе полимерных матриц (Пат. № 2504347) и конъюгатов с нано частицами селена (Пат. № 2557987, Пат. № 2645092) и золота для лечения заболеваний печени у животных.

Впервые изучены физико-химические, биодинамические и общетоксические свойства новых лекарственных форм силимарина.

Впервые изучена роль наночастиц селена и золота, в усилении гепатопротекторных свойств силимарина при дегенеративных поражениях печени у животных.

Впервые определено гепатопротекторное действие новых лекарственных форм силимарина на лабораторных моделях и установлен характер морфологических изменений, возникающих в ткани печени под воздействием разработанных лекарственных препаратов.

Впервые установлена терапевтическая эффективность новых лекарственных форм силимарина при лечении собак больных гепатитом, поросят с токсической дистрофией печени и при гепатозе у коров.

Впервые разработан комплекс лечебно-профилактических мероприятий патологий гепатобилиарной системы у продуктивных животных с применением разработанных новых лекарственных форм силимарина, а также препаратов, стимулирующих процесс регенерации и витаминных кормовых добавок.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы состоит в том, что в работе была изучена роль металлических и неметаллических наночастиц, как носителей лекарственных веществ к органам мишеням, были рассмотрены механизмы взаимодействия комплексов наночастиц конъюгированных с гепатопротектором – силимарином, как с гепатобилиарной, так и ретикулоэндотелиальной системой организма. Создан комплексный подход применения препаратов на основе коллоидных частиц металлической и неметаллической природы при лечении и профилактике заболеваний печени. Изучена роль наночастиц в формировании биодинамики лекарственного вещества и использование комплекса наночастиц в прерывании патологического процесса.

Практическая значимость работы состоит в том, что для лечения патологий печени предложены новые гепатопротекторные, инъекционные лекарственные формы силимарина на основе мицелл и нано частиц селена и золота.

В экспериментальной работе установлены параметры токсичности новых лекарственных форм силимарина, получены сведения о их переносимости и безопасности. Установлено, что разработанные лекарственные формы силимарина обладают высокой биодоступностью, не обладают местнораздражающими и аллергизирующими свойствами, по степени воздействия на организм согласно ГОСТ 12.1.007 относятся к 4 классу опасности – веществам малоопасным, не обладают сенсibiliзирующим действием.

Установлено гепатопротекторное действие новых лекарственных форм силимарина на изолированных гепатоцитах (in vitro) и лабораторных животных (in vivo).

Доказана безопасность применения новых лекарственных форм силимарина на целевых животных.

Установлена терапевтическая эффективность применения новых лекарственных форм силимарина при лечении заболеваний печени у поросят, коров и мелких домашних животных (собак).

Предложены схемы применения разработанных лекарственных форм силимарина, что позволяет рекомендовать их применение практической ветеринарной службе в животноводстве и клинической практике лечения мелких домашних животных.

Определена экономическая эффективность и целесообразность применения разработанных лекарственных форм силимарина при лечении заболеваний печени у поросят, коров и мелких домашних животных (собак).

Установлено, что наиболее эффективной является новая лекарственная форма силимарина, конъюгированного с нано частицами селена. Наиболее целесообразной дозой препарата при лечении животных с заболеваниями печени является дозировка 0,1 мл/кг массы животного.

Терапевтическая эффективность новой лекарственной формы силимарина, конъюгированного с нано частицами селена составляет 100%.

Связь исследований с научной программой

Диссертация выполнена в рамках научно-исследовательской работы в соответствии с планом НИР ФВМПибТ ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова.

Методология и методы исследований

Методологической основой выполнения работы явилось изучение современных способов коррекции патологических процессов гепатобиллиарной системы представленные в работах В.И. Десятник (1990, 2000), Я.И. Гонского (1996), А.И. Венгеровского (1999), Л.Ф. Виноградовой (2000), В.Н. Денисенко

(2002), В.В. Давыдова (2004), Л.Р. Королёвой (2005), Н.Б. Деминой (2007), В.З. Ланкина (2007), Е.В. Душкина (2008), М.А. Джавахян (2012), И.И. Калюжного (2010, 2012, 2015), М.С. Ларькиной (2011), И.А. Никулина (1999, 2002, 2005, 2008, 2013).

На основании этого была определена проблема в области изыскания инновационных подходов фармакологической коррекции заболеваний печени у животных. Это позволило разработать ряд лекарственных средств, направленных на повышение устойчивости печени к действию патогенных факторов, нормализацию функциональной активности и стимуляцию репаративно-регенерационных процессов в ней. Провести их сравнительную терапевтическую эффективность. На основании чего выбрать наиболее перспективный препарат для лечения и профилактики патологий гепатобилиарной системы у животных. В результате этого разработать комплекс лечебно-профилактических мероприятий патологий гепатобилиарной системы у животных.

Предмет исследований включал состояние гомеостаза организма животных, физико-химические, биодинамические и общетоксические свойства разработанных гепатопротекторных лекарственных препаратов. Их терапевтическая эффективность при патологических состояниях печени у сельскохозяйственных и мелких непродуктивных животных. Кровь лабораторных животных, коров, поросят и собак. Клинические, морфологические, биохимические исследования.

Объектом исследований явились коровы 2 - 3 периода лактации, плотоядные (собаки), поросята отъемного периода. Лабораторные животные (белые нелинейные мыши, мыши линии BALb/c, белые нелинейные крысы, кролики, морские свинки), гепатопротекторные препараты на основе полимерных матриц, наночастиц селена и золота конъюгированные с силимарином.

Методика исследований основана на применении современного сертифицированного оборудования. Исследования проводились с использованием клинических, гематологических, иммунологических и биохимических методов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- разработка новых лекарственных форм силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц;
- физико-химические, биодинамические и общетоксические свойства новых лекарственных форм силимарина;
- оценка гепатопротекторной активности разработанных лекарственных препаратов в экспериментах на изолированных гепатоцитах (*in vitro*) и лабораторных животных (*in vivo*);
- морфологические изменения, возникающие в ткани печени под воздействием разработанных лекарственных препаратов;
- специфическая гепатопротекторная активность разработанных препаратов при лечении гепатитов у собак, поросят с токсической дистрофией печени, при гепатозе у коров;
- комплекс лечебно-профилактических мероприятий патологий гепатобилиарной системы у животных с применением разработанных препаратов, а также препаратов, стимулирующих процесс регенерации и витаминных кормовых добавок.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные положения, заключение и практические предложения, сформулированные в диссертации, отвечают целям и задачам работы, а клинические, диагностические и экспериментальные исследования проведены на сертифицированном современном оборудовании. Достоверность полученных результатов проанализирована и подтверждается статистической обработкой данных.

Материалы исследований, полученные в ходе выполнения диссертации, были представлены и обсуждались на научно-практических конференциях профессорско-преподавательского состава и аспирантов Саратовского государственного аграрного университета имени Н.И. Вавилова в 2005-2017 гг.; на Международной научно-практической конференции «Агроэкологическое состояние АПК: опыт, поиски, решения» (Саратов, 2005); на VI, VII, VII, IX, X

Всероссийской научно-практической конференции «Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития» (Саратов, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010 гг.); Международной научно-практической конференции, посвященной 15-летию Саратовского регионального института переподготовки и повышения квалификации руководящих кадров и специалистов АПК (Саратов, 2006); на Юбилейной международной научно-практической конференции ветеринарных терапевтов и диагностов, посвященной 90-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РСФСР, академика РАЕ, доктора ветеринарных наук профессора А. А. Кабыша «Современные проблемы ветеринарной терапии и диагностики болезней животных» (Троицк, 2007 г.); на Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития» (Саратов, 2010); на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной ветеринарии» (Краснодар, 2011); на Международной научно-практической конференции «От теории – к практике: вопросы современной ветеринарии, биотехнологии и медицины» (Саратов, 2011); на Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина 21 века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития» (Саратов, 2012); на Международной научно-практической конференции посвящённой 100-летию «СГАУ им. Н.И. Вавилова» «Современные проблемы ветеринарии, зоотехнии и биотехнологии», (Саратов, 2013); на Международной научно-практической конференции «Современные проблемы ветеринарной онкологии и иммунологии» (Саратов, 2014); на Международной научно-практической конференции, посвящённой 85-летию со дня рождения доктора сельскохозяйственных наук, Почётного работника ВПО РФ, профессора кафедры "Кормление, зоогигиена и аквакультура" СГАУ им. Н.И. Вавилова Коробова Александра Петровича «Современные способы повышения продуктивных качеств сельскохозяйственных животных, птицы и рыбы в свете импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны» (Саратов, 2015); на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной хирургии, онкологии и терапии» (Саратов, 2016).

Личный вклад соискателя. В работе представлены данные исследований, проведенных в период с 2006 по 2017 годы. Основная часть клинико-экспериментальных данных, а также систематизация и анализ полученных результатов выполнены автором лично.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 67 научных работ, которые отражают основное содержание диссертации. Из них 13 статей в рецензируемых научных журналах, включённых в Перечень ВАК Минобрнауки РФ, 5 в изданиях, включенных в базу данных Scopus и Web of Science. На основании результатов научных исследований выданы 8 патентов РФ на изобретения.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 357 листах машинописного текста и включает: введение, обзор научной литературы, собственные исследования, включающие разделы: материалы и методы, результаты собственных исследований, их обсуждение, заключение, производственные рекомендации, список литературы и 19 приложений. Список литературы содержит 390 источников, в том числе 174 иностранных. Работа содержит 88 таблиц, 45 иллюстраций.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Анализ заболеваемости, этиология и патогенез заболеваний печени у животных

Печень занимает центральное место в процессах углеводного, белкового, липидного обменов, хранения, метаболизма и активации витаминов, экстрамедуллярного гематопоэза, синтезе коагулянтов и антикоагулянтов, белков острой фазы, пищеварении путем синтеза и энтерогепатической циркуляции желчных кислот, а также в процессах детоксикации эндогенных и экзогенных соединений, токсинов и ксенобиотиков посредством их расщепления, окисления, декарбоксилирования (М.З. Андрейцев, 2005). Заболевания печени занимают важное место в структуре заболеваемости: согласно ретроспективному анализу патологии гепатобилиарной системы животных составляют 5 - 30% (С.Н. Жерлицын, 2016.). Несмотря на то, что печень является одним из немногих органов, способных к полному восстановлению после повреждения, благодаря регенерации, происходящей в следствие организованной пролиферации всех типов клеток и последующего восстановления функций, существуют множество факторов, способствующих развитию значительного повреждения органа (Л.Ф. Виноградова, Ж.А. Мирзоян, Е.В. Харлицкая, Н.С. Манякина, 2000).

Мощным этиологическим фактором возникновения заболеваний печени является неполноценное несбалансированное кормление, загрязнение промышленными отходами вод, использование недоброкачественных кормов, инфекционные заболевания, отравления токсинами различного происхождения, химическими ядами. Гепатопатии возникают также при хронических поражениях желудочно-кишечного тракта, почек и других органов, как сопутствующие заболевания при нарушениях обмена веществ, в следствие применения лекарственных средств, обладающих гепатотоксическим эффектом (E.S. Haskett, D.C. Twedt, D.L. Gustafson, 2013; H. Kauntz [et al.], 2011, В.А. Оробец, 2012).

Наиболее важными являются поражения печени токсическими веществами, поскольку в печени ксенобиотики проходят ряд превращений, в результате

которых могут получаться биологически активные метаболиты, поражающие орган (К.К. Шульгин [и др.], 2008). В настоящее время зарегистрировано более 8000 гепатотоксических веществ, среди которых наиболее опасны тетрахлорметан, хлороформ, бензол и его производные, соединения меди, железа, мышьяка, акриламид, аллиловый спирт, нитрозодиметиламин (D. Larrey, 2009). Кроме того, согласно данным, приведенным А. Lavasanifar (A. Lavasanifar, 2002), 53% всех лекарственных средств способны вызвать идиосинкразические поражения печени. Среди них: анаболические стероидные средства, антибиотики, нестероидные противовоспалительные средства, сульфаниламиды и другое (J.J. Lah, W. Cui, K.Q. Hu, 2007).

В целом токсины принято подразделять на облигатные (воздействующие напрямую) и факультативные (косвенно воздействующие) гепатотоксиканты (J.J. Lah, W. Cui, K.Q. Hu, 2007). Облигатные гепатотоксиканты - вещества, которые вызывают дозозависимый эффект. Повреждение печени вызывается потому что облигатный гепатотоксин не может подвергнуться детоксикации в печени, либо потому что процессы биотрансформации не происходят достаточно быстро. За короткий промежуток времени поражаются клеточные структуры, а именно происходит инактивация ферментов промежуточного метаболизма, денатурации клеточных белков или перекисидации липидов. Это ведет к жировой инфильтрации или некрозу гепатоцитов (Д.В. Гарбузенко, 2008). Облигатные гепатотоксиканты редко используются как лекарственные средства, поскольку их токсическое действие на печень устанавливается на ранней стадии исследования вещества на лабораторных животных. Однако некоторые вещества могут быть использованы в лечебных целях, если их терапевтический эффект превосходит гепатотоксическое действие (например, эффективный цитостатик). Также следует отметить, что некоторые лекарственные средства, не обладающие гепатотоксичным действием, могут стать облигатными токсикантами при передозировке (изониазид, парацетамол, тетрациклин, метотрексат и другие) (E J.J. Lah, W. Cui, 2007).

Механизм повреждения органа прямыми гепатотоксикантами выглядит следующим образом. Когда нарушается или преодолевается механизмов клеточной защиты, токсичные метаболиты могут повредить важные клетки-мишени. Эти токсичные метаболиты могут быть электрофильными, ковалентно связывающимися с белками или свободными радикалами и вызывающими перекисное окисление липидов и окисление белковых тиолов. Сильное нарушение клеточных функций приводит к клеточной гибели. Клеточная смерть может наступить в результате четырех механизмов: 1) изменение плазматической мембраны и нарушение цитоскелета; 2) нарушение митохондриальных функций; 3) нарушение внутриклеточного ионного гомеостаза; 4) активация разрушения энзимов. (N.M. Al-Rasheed, 2013, A. Lavasanifar, 2002).

Изменение плазматической мембраны. Поскольку, печень на 80% состоит из мембран, то ее работа определяется, в большей степени, нормальным функционированием последних. Воздействие прямых и опосредованных токсических агентов на митохондриальные и цитоплазматические мембраны гепатоцитов ведет к возникновению нарушений внутриклеточного обмена веществ, разрывов в структуре мембран, которые являются причиной гибели клетки (N.M. Al-Rasheed, 2013). Основу всех мембран составляют фосфолипиды. В частности, матрица гепатоцитов состоит из фосфолипидов на 65%. Фосфолипиды – сложные липиды, сложные эфиры многоатомных спиртов, в которых одна из спиртовых групп связана с фосфорной кислотой. В зависимости от входящего в состав эфира многоатомного спирта различают: глицерофосфолипиды, содержащие остаток глицерина, фосфосфинголипиды, содержащие остаток сфингозина, и фосфоинозитиды, содержащие остаток инозитола. (B.W. Barry, 2002, A. Lavasanifar, 2002).

Фосфолипиды состоят из гидрофильной части («головки») и гидрофобного ацильного «хвоста». Различные варианты строения головных групп и алифатических цепей определяют существование более 100 видов фосфолипидов в эукариотических клетках (C. Venstoen [et al.], 2015). Основными фосфолипидами являются: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин,

фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, кардиолипин, сфингомиелин и гликофинголипиды. В большинстве эукариотических мембран фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин вместе составляют около 60-85% фракции фосфолипидов, в то время как количество других фосфолипидов мало, но значительные различия могут отмечаться от типа клеточной мембраны и даже видов животных. (B.W. Barry, 2002; X-Y. Bai [et al.], 2003). К тому же фосфатидилхинон характеризуется более низкой окисляемостью и преимущественно локализуется во внешнем слое биологических мембран, так как является более насыщенным по сравнению с другими фосфолипидами. (К.М. Маракулина, 2016). Фосфолипиды играют важную роль при формировании барьера, регулирующего проницаемость клеточной мембраны и мембран внутриклеточных органелл, участвуют в процессах молекулярного транспорта, деления и дифференциации клеток, обеспечивают протекание многих каталитических процессов, активирует ферментативные системы. (M.S. Khan, G.D. Vishakante, H. Siddaramaiah, 2013). Повреждение липидного бислоя, связанное с изменением вязкости, как правило, сопряжено с перекисным окислением липидов (ПОЛ). В первую очередь этот процесс затрагивает фосфолипиды, состоящие из большого количества ненасыщенных жирных кислот (Ю.А. Владимиров, 2000). Свободные радикалы, образующиеся в результате перекисного окисления липидов, являются основными факторами, нарушающими барьерную и матриксную функции плазматической мембраны внутриклеточных органоидов гепатоцитов. К числу этих агрессивных свободных радикалов относятся: пероксинитрит, синглетный кислород (O_2), гидроперекиси липидов, хлорамин (Я.И. Гонский, 1996). При ПОЛ происходит окисление сульфгидрильных групп мембраносвязанных белков и ферментов, что приводит к замедлению удалению ионов Ca^{2+} , поскольку инактивируется кальций-зависимая АТФ-аза. В результате повреждения мембран везикулярных внутриклеточных образований, содержащих активные ферменты (лизосомы, пероксисомы, микросомы) происходит освобождение энзимов, ведущее к разрушению клетки (Д.Л. Щербаков, 2015).

Нарушение работы митохондрий. Отсутствие потенциала у мембран митохондрий ведет к уменьшению окислительного фосфорилирования, истощению запасов АТФ в клетке, выходу цитохрома-С в цитоплазму и активации каспаз, вызывающих апоптоз. В условиях ПОЛ апоптоз выступает как патологический процесс, хотя является физиологическим (S.R. Wells [et al.], 2010). Также в мембране митохондрий происходит формирование каналов, через которые осуществляется выход калия. Вследствие данного процесса внутри органелл повышается осмотическое давление, что вызывает набухание (Warheads Shanta Dhar [et al.], 2009)

Нарушение ионного внутриклеточного гомеостаза. Данный феномен является ранним проявлением цитотоксичности. Связь между повышением концентрации цитозольного кальция и смертью клеток из-за различных причин была особенно хорошо изучена и является начальным механизмом, который обуславливает переход от обратимых к необратимым изменениям функций клетки. Реактивные метаболиты могут разрушать кальциевые помпы (Ca^{2+} -АТФазы) путем ковалентного связывания или окисления тиолов (И.Д. Стальная, 1977). Повышение уровня внутриклеточного цитозольного кальция нарушает цитоскелет и активирует Ca^{2+} -зависимые дегидратирующие ферменты (H.J. Yen [et al.], 2009).

Активация разрушающих ферментов. Активированные энзимы в цитозоле разрушают ферменты и структурные белки (протеазы), «переваривают» мембраны, тем самым высвобождая арахидонат (фосфолипазы), и фрагменты ДНК (эндонуклеазы) (S.L. Booth [et al.], 2004).

Напротив, факультативные (косвенные) являются причиной поражения печени только в некоторых случаях, в зависимости от индивидуальной чувствительности организма, то есть предсказать возникновение патологии в данном случае невозможно. Факультативные повреждения печени являются результатом интерференции метаболитов чужеродных веществ (которые по сути являются биотоксиметаболитами), вызывающие специфические реакции в процессе промежуточного метаболизма. Первичные нарушения обмена веществ

включают в себя, например, алкилирование или ацилирование белков, нехватка АТФ или УТФ, блокирование рецепторов и функциональную активность сульфгидрильных (SH) групп ферментов (В.И. Альбанова, К.С. Гузев, К.В. Ноздрин, 2007; И.Ю. Пирогова и соавт., 2013). В дальнейшем нарушения приводят к структурным повреждениям: стеатозам или некрозам клеток печени, холестазу, а также к возникновению новообразований. Вышеназванные нарушения отражают особенности факультативных гепатотоксинов. Причиной возникновения идиосинкразических повреждений печени являются факультативные гепатотоксины. Поражения появляются только у особей с повышенной гиперчувствительностью к чужеродным веществам или их метаболитам. Идиосинкразическое повреждение печени может иметь иммунологический и метаболический характер. При иммунологическом типе гепатотоксичности чужеродные вещества или некоторые их метаболиты связываются с белком гепатоцитов. Это ведет к продукции гаптена (антигена), который в свою очередь приводит к возникновению гуморального или клеточного иммунного ответа, в результате определяются аутоантитела, в частности LKM-2 и LKM -3 (K.Brock [et al.], 2004). Часто вышеописанные процессы сопровождаются аллергическими симптомами (экзантема, зуд, эозинофилия), а также проявляется соответствующим образом регистрируемыми, гистологическими изменениями (гранулема, эозинофильная инфильтрация) (Н.П. Пальмина [и др.], 2004). Метаболический тип проявляется в аномальной метаболической реакции, которая происходит у малого количества подверженных особей, имеющих высокую чувствительность к ксенобиотикам или их метаболитам. В целом, такое проявление аномальных процессов генетически детерминировано и является результатом синтеза биотоксикометаболитов (K.Brock [et al.], 2004)

Однако оба типа повреждения вследствие воздействия факультативных гепатотоксинов не могут объяснить всех патологических метаболических эффектов, таких как случайное появление аллергенов, мутагенов, проканцерогенов, новых токсинов (А.М. Drotleff, W. Ternes, 2001). Таким образом, возможны следующие две гипотезы: с одной стороны, «конечные

продукты» возникают в результате комбинированного токсического и идиосинкразического действия, с другой, «конечные продукты» могут развиваться в результате связывания биотоксиметаболитов с конкретными клеточными протеинами, иногда к «поврежденным» белкам после появления токсических изменений печени. (K.Brock [et al.], 2004).

Противодействию повреждающему действию продуктов ПОЛ и активных кислородных метаболитов оказывает антиокислительная система, действующими элементами которой являются глутатион, антиокислительные ферменты - супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидаза глутатиона, металлосвязывающие протеиназы (ферритин и церуллоплазмин), витамины Е, С, бета-каротин (А.М. Drotleff, W. Ternes, 2001). Активное протекание свободнорадикальных процессов и ответная реакция тканей и систем организма получила название окислительного стресса. Вышеназванный процесс возникает при нарушении баланса между чрезмерным количеством активных форм кислорода и перерабатывающей способностью антиокислительной системы (D. Li, 1999). Также необходимо заметить, что интенсивность процессов ПОЛ в большей степени зависит от уровня ионов металлов с переменной валентностью, например, Fe^{2+} , концентрация которого возрастает из-за высвобождения из внеклеточных и внутриклеточных депо. Кроме того, концентрация ионов может увеличиваться за счет Fe-S-кластера аконитазы супероксидным радикалом, поскольку происходит распад Fe^{2+} -содержащих белков и процессы восстановления Fe^{3+} ионов в составе ферритина при участии SH-соединений свободных аминокислот и аскорбатата (J.J. Chen, В.Р. Yu, 1994). Следует добавить, что наиболее агрессивная форма кислорода-гидроксильный радикал-образуется при участии ионов Fe^{2+} .

Помимо реакций перекисного окисления липидов свободные радикалы запускают продукцию противовоспалительных цитокинов, которые представляют собой плеотропные регуляторные пептиды, способные продуцироваться многими ядерными клетками и клетками печени (паренхиматозными и непаренхиматозными). На данный момент наиболее изучены механизмы действия фактора некроза опухоли- α , интерлейкинов (-6,-8), интерферонов, хемокинов и

т.д. (J.-F. Gagne [et al.], 2002). Среди вышеперечисленных факторов больше всего на печень негативное влияние оказывает фактор некроза опухоли- α . Доказана особая роль фактора в стимуляции фиброза в печеночных клетках. Фактор осуществляет активацию ковалентных факторов некроза опухоли- α , что приводит к образованию большого числа активных пептидов, участвующих в реализации и формировании иммунного ответа – каспаз, киназ, протеаз (J.-F. Gagne [et al.], 2002). Однако основным субстратом индуцированной смерти вышеперечисленным фактором являются митохондрии (J.-F. Gagne [et al.], 2002).

Важным аспектом является тот факт, что в состоянии физиологического оптимума устанавливается равновесие между уровнем свободнорадикального окисления и активностью системы антиокислительной защиты, поддерживающие процессы ПОЛ на низком уровне в условиях значительных изменений при образовании свободных радикалов (Sofia Moreira-Silva, 2016). Но если токсический фактор продолжает действовать в течение длительного времени, то антиокислительная защита истощается, что ведет к усилению свободнорадикального окисления, а в дальнейшем - развитие необратимых изменений (С.М. Vula [et al.], 2005). В современной литературе дисбаланс между про- и антиокислительными процессами обозначается как «окислительный стресс».

Процессы ПОЛ и образование агрессивных форм кислорода, однако, не являются патологическими процессами, а постоянно протекают в организме и участвуют в накоплении энергии и процессе обмена веществ, делении клеток, росту их количества, синтезе простагландинов, микробоцидном действии фагоцитов, в нормализации метаболизма клетки (X-Y. Bai [et al.], 2003, D.Bikle, S.L. Booth [et al.], 2004, K.Brock [et al.], 2004, С.М. Vula [et al.], 2005).

Функции, которые способны осуществлять активные метаболиты кислорода сходны тем функциям, которые развиваются под действием биорегуляторных молекул – от активации или обратимого ингибирования до регуляции активности генома. Активные формы кислорода нашли свое применение в медицине – озон, перекись водорода (S.L. Booth [et al.], 2004).

Также немаловажную биологическую роль в организме играет оксид азота (NO). Оксид азота может выступать как цитопротективный и цитотоксический агент. Известны данные о регуляции биосинтеза NO, механизмах действия. Вывалена связь между развитием окислительного стресса и NO в качестве про-так и антиоксиданта. Поскольку оксид азота способен взаимодействовать с различными радикалами (O_2 , L-, LO-, LO₂), то возможно развитие прерывания цепи свободнорадикального ПОЛ, связывая железо, являющееся активатором вышеназванного процесса. NO может при недостаточном поступлении также приводит к активации ПОЛ и свободнорадикальному повреждению мембран (S.L. Booth [et al.], 2004). При этом при взаимодействии NO с O² образуется повреждающий липиды, ДНК и белки прямые реакции окисления или не прямые радикал-опосредованные механизмы, в том числе и ПОЛ (M.L. Colombo, 2010). Другим не мало важным фактором является развитие мезенхимально-воспалительного синдрома, проявление которого характеризуются гипергаммаглобулинемией, повышением белково-осадочных проб, появлением в крови продуктов разрушения соединительной ткани. Отмечаются изменения в ходе гуморальных и клеточных иммунных реакций: возрастает количество иммуоглобулинов классов G, M, A; появление аутоантител к органеллам и клеточным элементам гепатоцита; увеличение количества и активности Т- и В-лимфоцитов (S.M. Graham [et al.], 2007).

В развитии синдромов цитолиза и холестаза, которые развиваются преимущественно при всех поражениях гепатобилиарной системы, являются ответной реакцией на действие различных повреждающих факторов. Цитолизом называют процесс разрушения клеток, выражающийся в полном или частичном растворении под действием лизосомальных ферментов (В.В. Давыдов, И.В. Захарченко, В.Г. Овсянников, 2004). При этом, как и апоптоз, является физиологическим процессом, но выступает как патологический при повреждении клетки внешними. Так при данном процессе происходит переход воды внутрь клетки, то результатом является разрыв оболочки клетки. Индикаторами данного процесса являются увеличение активности индикаторных ферментов печени -

аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, γ -глутамилтранспептидазы и кислой фосфатазы. При цитолизе отмечаются следующие морфологические изменения: периваскулярный, перицеллюлярный отек, экссудация с миграцией клеточных элементов, зернистая и жировая дистрофия (E.J. Heathcote, 2007).

Холестаз обуславливается уменьшением тока желчи из-за нарушения секреции гепатоцитами или обструкции желчных протоков. Холестатический синдром подразделяют на внутрипеченочный и внепеченочный. Внутрипеченочный холестаз обусловлен нарушениями синтеза желчных компонентов и их поступлением в желчные капилляры (P. Mascio Di, M.E. Murphy, H. Sies, 1991). Внепеченочный холестаз вызван нарушением прохождения по желчевыводящим путям в связи с нарушением функции желчевыводящей системы. На развитие холестатического синдрома влияет нарушение метаболизма холестирина, а также нарушение образование компонентов желчи, сопряженное с изменением процессов синтеза и разрушения холестирина в гепатоцитах (P. Mascio Di, M.E. Murphy, H. Sies, 1991). Следует отметить, что при острых и хронических поражениях печени четыреххлористым углеродом количество секретируемой желчи снижается вместе со скоростью выделения желчных кислот, желчных пигментов (P. Mascio Di, M.E. Murphy, H. Sies, 1991).

В зависимости от типа поступившего токсина различаются и механизмы повреждения гепатоцитов. Так, например, четыреххлористый углерод вызывает нарушение функций ферментативных систем эндоплазматического ретикулума. Воздействие тяжелых металлов приводит к повреждению гепатоцитов путем блокирования функциональную активность сульфгидрильных (SH) групп ферментов. Усиление перекисного окисления липидов, входящих в состав мембран, вызывают тетрахлорметан, аллиловый спирт (D. Larrey, 2009). При этом токсический эффект токсикантов в основном определяется функциональной активностью ферментативных систем, принимающих участие в процессах трансформации и детоксикации ксенобиотиков. Возможна генетическая

детерминация индукции или ингибирования ряда изоферментов цитохрома P₄₅₀ и ферментов конъюгации (H. Jiunn Lin, H.Y. Lu, 1997). Данный факт объясняет различную степень чувствительности к действию токсинов на орган. Так при высокой степени активности цитохрома P₄₅₀ клетки печени оказываются более чувствительны к четыреххлористому углероду и парацетомолу; этанол, ацетон и длительное голодание могут вызвать повышение активности цитохрома P₄₅₀, в то время как диэтилдитиокарбамат и диметилсульфоксид наоборот, снижают активность цитохрома, что и обуславливает степень гепатотоксичности вышеперечисленных веществ. (R.J. Colonna [et al.], 2006). Вирусная инфекция наряду с этиловым спиртом, повреждая печень, увеличивает чувствительность органа к гепатотропным ядам. Проявление токсического эффекта может усиливаться дефицитом белка в организме и бактериальными инфекциями. (U.Lindh, A. Danersund, A. Lindvall, 1996).

Морфофункциональные изменения ткани печени зависят от химической структуры, дозы и путей поступления гепатотоксикантов в организм. К этим изменениям относятся балочная и жировая дистрофия, центрлобулярный некроз гепатоцитов, который может закончиться восстановлением нормальной структуры, если в последующем будет исключено действие гепатотоксичных факторов (D.R. Green, 2005). В случае острых интоксикационных процессов могут формироваться субмассивные и массивные некрозы паренхимы (A.M. Drotleff, W. Ternes, 2001).

Отмирание клеток печени проходят через несколько этапов. Сначала повреждается плазматическая мембрана, затем происходит набухание митохондрий вследствие повреждения мембраны последних и нарушение ионного равновесия, далее наступает дезинтеграция ядра с последующим фагоцитозом погибших клеток. Факторы, запускающие некротические процессы, были описаны выше. Некроз гепатоцитов происходит с возникновением и развитием воспалительного процесса, в который включаются окружающие ткани (Y. Liu [et al.], 2011). Благодаря высокой способностью к регенерации, некротизированные участки в печени уничтожаются и заменяются новыми. Таким образом

происходит восстановление структуры и функции органа. Но все процессы восстановления возможны до определенного момента, пока количество гепатоцитов не станет критически мало (Y. Liu [et al.], 2011).

Процесс клеточной гибели при поражениях печени происходит также и по механизму апоптоза. Запуску апоптоза предшествует снижение электрохимического потенциала плазматической мембраны и активация продукции активных радикалов (Е.Б. Бурлакова, 1985). В процессе вышеназванного типа клеточной гибели происходят морфологические изменения, а именно: образование мембранных вакуолей и пузырьков, агрегация хроматина, образованием апоптотических телец с их последующим фагоцитозом. При данном типе клеточной гибели воспалительный процесс не возникает. Стоит отметить, что одни и те же факторы могут вызывать как апоптоз, так и некроз (М.Д. Машковский, 2010).

В случае хронических повреждений печени чаще наблюдают развитие жировой дистрофии печени (М.Д. Машковский, 2010).

Как было сказано выше, среди всех незаразных болезней животных 5-30% приходится на патологии печени (С.Н. Жерлицын, 2016.). Согласно исследованиям последнего времени, отмечается рост патологий данной группы. Основной причиной является нарушение технологии содержания и кормления животных. Наиболее распространенными и экономически значимыми остаются: гепатиты, гепатозы, циррозы, холециститы и желчнокаменная болезнь (Н.Б. Демина, 2007). Среди сельскохозяйственных животных, заболевания печени являются один из основных факторов экономического ущерба. Например, токсическая дистрофия печени, которая наиболее часто отмечается у поросят. Данное заболевание проявляется дегенеративными и некротическими изменениями печени. При этом отмечают развитие функциональной недостаточности, последующей интоксикации организма и нарушения метаболизма (В.В. Емельянов, И.З. Севрюк, 2005). Восприимчив молодняк – поросята-сосуны и отъемыши. Из причин возникновения данного заболевания отмечают недостаточность селена и витамина Е в кормах свиноматок,

потребление недоброкачественных кормов (Е.В. Душкин, 2007). В процессе развития заболевания снижается продукция фосфолипидов, из-за отсутствия антиоксидантных веществ (в частности витамина Е и селена) в организме животного. Тогда отмечают переход жира в общий круг кровообращения, по которому он попадает в печеночные клетки, где начинают развиваться процессы жирового перерождения печени, ведущего к некробиозу гепатоцитов (А.В. Жаров, Ю.П. Жарова, 2012). На крупных свиноводческих комплексах данное заболевание может возникать в течение всего года и, в совокупности с другими патологиями, приводит к падежу, составляющему до 60% среди молодняка (В.В. Емельянов, И.З. Севрюк, 2005).

Поскольку в последнее время отмечается возрастающий интерес к мелким непродуктивным животным, то наиболее изучена распространенность заболеваний печени у кошек и собак (Е.А. Кесарева, В.Н. Денисенко, 2004). Так, согласно статистическим данным, среди всех патологий печени в процентном отношении следующие заболевания составляют: гепатит 18-20%, метастазирующие опухоли 14%, портальная гипертензия 9 %, порто-системные шунты 6%, фиброз 5,5 %, кисты 5%, жировая дистрофия 4%, опухоли 3,8%, цирроз 2%, прочие болезни печени 34%. Из заболеваний печени у кошек наиболее распространены: гепатиты (23%), гепатопатии (14%), метастазирующие опухоли (13,8%) и липидоз (12%) среди собак и гепатит (22,9%), гепатопатия (13,5%), метастазирующие опухоли (12,8%) и липидоз (11%) среди кошек (С.Н. Жерлицын, 2016).

Наиболее распространенными заболеваниями печени воспалительного характера у собак являются: неспецифический реактивный гепатит, хронический гепатит и острый гепатит. Другие распространенные причины заболеваний печени у собак включают неоплазию, сосудистые аномалии (то есть портосистемные шунты) и патологии желчного тракта (С.Н. Жерлицын, 2016).

Неспецифический реактивный гепатит представляет собой неспецифический ответ на заболевания внепеченочной этиологии. Гистологически поражение характеризуется воспалительной инфильтрацией в

области печеночных долек и в паренхиме печени, отмечаются некрозы отдельных клеток (M.L. Colombo, 2010). Заболевание является следствием внепеченочной патологии, терапия должна быть направлена на устранение первичного фактора (M.L. Colombo, 2010).

Согласно определению, данному WSAVA, острый гепатит морфологически характеризуется как воспалительный процесс, сопровождающийся гепатоцеллюлярным апоптозом и некрозом. Зарегистрировано меньше случаев появления острого гепатита, чем хронического. Причинами, вызывающими заболевание, могут быть вирус гепатита собак (CAV-1), вирус герпеса собак, индуцированный препаратом и токсином-гепатит, лептоспироз, *Bacillus piliformis* (болезнь Тиззера), *Toxoplasma gondii* и ряд других и септических бактериальных заболеваний (I. Apalkova, 2012).

Гепатиты, вызванные бактериями не распространены (I. Apalkova, 2012), но скорее всего чаще всего патологии печени вызывают бактерии рода *Leptospira*. Считается, что применение лекарств и попадание токсинов наиболее распространенная причина развития острого гепатита. Любое лекарство может вызвать идиосинкразическую реакцию. Некоторые лекарства изначально могут оказывать негативное действия на клетки печени посредством специфических реакций. Среди таких лекарственных средств более известен парацетомол, который способен вызвать поражения печени в зависимости от концентрации вводимого лекарственного средства (I. Apalkova, 2012). Однако большинство случаев острого гепатита являются идиопатическими. Клинические признаки острого гепатита обычно неспецифичны и включают ухудшение работы желудочно-кишечного тракта, потерю веса и аппетита, полиурию и полидипсию. Также могут развиваться симптомы печеночной энцефалопатии. Результаты физикального обследования, как правило, мало информативны. Однако при пальпации можно регистрировать увеличение печени в размере. Лихорадка или другие общие клинические признаки заболеваний могут присутствовать у животных, которые имеют вирусную этиологию острого гепатита (I. Apalkova, 2012).

Биохимический анализ крови часто является первым шагом в диагностике гепатопатий. При остром гепатите можно обнаружить повышение активности аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и гамма-глутамилтрансферазы. Дифференцировать случаи острого и хронического гепатитов на основе биохимического анализа невозможно, о стоит заметить, что скорее всего у собак при остром гепатите функциональные пробы печени будут нормальными (А.А. Кириллов, П.Н. Юшманов, А.Я. Батраков, 2015).

Пациенты с подозрением на острый гепатит должны быть проверены на лептоспироз, особенно если отмечается параллельно почечная недостаточность. Рентгенография позволит оценить размеры печени, однако абдоминальная ультрасонография будет предпочтительнее в плане визуализации и позволит оценить форму, размер и экзогенность печени, а также дифференцировать диффузную от очаговой патологии (Д.О. Коваленко, 2012). Все вышеописанные методы могут помочь при постановке диагноза, но окончательно диагноз возможно установить только после гистологического исследования ткани печени (Apalkova I., 2012).

Согласно исследованиям, I. Apalkova, 2012, хронический гепатит считается наиболее распространенным заболеванием печени среди мелких непродуктивных животных, при чем в большинстве случаев этиология остаётся неясной. Имеются данные о природной предрасположенности следующих пород собак к возникновению данного заболевания: бедлингтон-терьеры, далматинцы, лабрадор-ретриверы, вест-хайленд-уайт-терьеры, скайтерьеры, доберманы, английские и американские коккер-спаниели, английские спрингер-спаниели. В целом, заболевания печени, которые длятся от 4 до 6 месяцев определяется как «хронический» (I. Apalkova, 2012). Хронический гепатит гистологическая картина отличается. Развитие фиброза является ключевым патологическим изменением, которое приводит к развитию хронического гепатита (I. Apalkova, 2012).

Гистологическая картина хронического гепатита характеризуется обильной инфильтрацией плазматическими клетками и лимфоцитами с наличием участками гепатоцеллюлярного апоптоза или некроза, регенерации и фиброза (I. Apalkova,

2012). Развитие фиброза является основным изменением, которое ведет к развитию хронического гепатита. Фиброзная ткань в печени изменяет кровоток, что впоследствии приводит к развитию внутрипеченочной портальной гипертензии (I. Apalkova, 2012).

В большинстве случаев при развитии хронического гепатита невозможно выявить основную причину заболевания, поэтому заболевание характеризуют как «идиопатический хронический гепатит» (I. Apalkova, 2012)

Известно несколько потенциальных причин возникновения хронического гепатита. К ним относятся:

- Перенесенные инфекционные заболевания (аденовирус-1 (CAV-1));
- Лептоспироз - различные сероварианты оказывают острое заболевание всего организма, поражающее почки, печень и другие органы (I. Apalkova, 2012). Лептоспироз – острое протекающее заболевание, в первую очередь поражающее почки, но также могут вызывать реактивный гепатит с внутрипеченочным холестазом (I. Apalkova, 2012). Известно, что лептоспироз вызывает развитие острого гепатита, а иногда и хронического гепатита. Другие микроорганизмы редко являются причиной хронического гепатита;
- Медь - накопление количества данного микроэлемента выше физиологически нормального уровня описан для некоторых пород собак. Различные формы этого состояния встречаются у бедлингтон-терьеров. Такие животные выводят медь в желчный тракт, что способствует образованию активных форм кислорода и в последующем повреждению гепатоцитов и развитию хронического гепатита и цирроза печени. Накопление происходит в центрoлoбулярной зоне в течение жизни животного. При исследовании ткани печени регистрируют концентрацию меди, превышающую 2000 промилли. Преимущественно указывается, что высокая концентрация меди может стать причиной возникновения заболеваний печени (I. Apalkova, 2012). Другая форма, связанного с медью заболевания, встречается у Скай-терьеров, Вест-хайленд-уайт-терьеров, доберманов, у которых медь накапливается в процессе развития воспалительного заболевания печени или холестаза, а также повышенного

потребления пищи (I. Apalkova, 2012). При этом типе развития заболевания медь не накапливается в течение всей жизни животного, и ее концентрация в печени не коррелирует с тяжестью протекания гепатита (I. Apalkova, 2012).

- Аутоимунная реакция. Несмотря на то, что имеются некоторые публикации, описывающие возможную роль компонентов иммунной системы в этиологии хронического гепатита, на данный момент нет убедительно доказывающих исследований касательно аутоиммунной этиологии развития гепатита (I. Apalkova, 2012)

- Токсины и лекарственные средства. Чаще всего с данными факторами связывают развитие острого процесса, однако некоторые вещества из данного ряда могут вызывать хроническое заболевание (например, фенобарбитал). Некоторые микотоксины (например, афлатоксин) могут вызывать либо острый, либо хронический процесс в зависимости от дозы и времени воздействия (I. Apalkova, 2012).

Во всех случаях, исключая спаниелей, сообщалось, что совместно с развитием хронического гепатита, в печени происходила аккумуляция меди. Генетическая предрасположенность к накоплению меди в печени при развитии хронического гепатита впервые была отмечена у бедлингтон-терьеров. Это единственная порода, в которой был определен ген, отвечающий за накопление меди. Также доказан наследственный характер первичного медного токсикоза по крайней мере у Вест-хайленд-уайт-терьеров, лабрадоров и далматинов. Однако по данным исследования (I. Apalkova, 2012) увеличение концентрации меди на фоне хронического гепатита было обнаружено у 28,1% исследованных собак разных пород. По другим данным только средняя концентрация накопления меди способна быть причиной воспаления или холестаза (I. Apalkova, 2012). Следовательно, только большая концентрация накопленной в печени меди способна вызвать первичное расстройство накопления. Также предполагается, что накопление меди в центробулярной области, более чем в перипортальной, связано с первичным накоплением меди. У кошек накопление меди считается редким. У некоторых кошек медь была обнаружена в центробулярном регионе, хотя

распределение не было связано с определенным гистологическим диагнозом (I. Aralkova, 2012).

Болезни печени, которые характеризуются дистрофическими изменениями печёночной паренхимы при отсутствии выраженных признаков воспаления носят название гепатозов. Различают жировую дистрофию печени (жировой гепатоз), амилоидная дистрофия – амилоидоз и другие виды дистрофии. Дифференцируют в зависимости от этиологических факторов, их силы и продолжительности действия (И.Ф. Хазимухаметова, Э.М. Баширова, 2009).

Жировая дистрофия (жировой гепатоз, стеатоз печени) характеризуются накоплением триглицеридов в гепатоцитах и нарушением основных функций печени. В связи с этим выделяют острое течение заболевания (острый гепатоз) и хроническое течение (И.Ф. Хазимухаметова, Р.Р. Идрисова, 2008). Хроническое течение регистрируется чаще. В условиях повышенной нагрузки на продуктивных животных жировой гепатоз является одним из основных заболеваний высокопродуктивных коров, животных на откорме (Р.А. Мерзленко 2012, 2013, 2014). Встречается также у свиней, пушных зверей. Из мелких непродуктивных – у собак (Б.И. Шулутко, 1995).

В печени на фоне протекания хронических инфекций или онкологического процесса как вторичное заболевание может регистрироваться амилоидоз – отложение в гепатоцитах амилоида. Данная патология сопровождается увеличением размеров печени, нарушением кровообращения в органе, развитием печеночной недостаточности. Для постановки диагноза необходимо провести биопсию печени (Ю.А. Петрович, А.И. Воложин, В.А. Зубцов, С.М. Киченко, 2007).

Из причин возникновения вышеназванного патологического процесса отмечают в первую очередь интоксикацию организма. Интоксикация может быть вызвана как испорченными кормами, ядами растительного и животного происхождения, монокормление белковыми кормами, избыточное содержание в рационе жома, барды, недостаток серосодержащих аминокислот (метионина, цистина, холина) (М.Е. Павлов, 2007).

Одностороннее белковое кормление негативно сказывается на метаболизме, а именно происходит избыточное накопление. Создаются условия, которые ведут к перегрузке паренхимы печени липидами, всосавшимися из кишечника и поступающими из жировых депо организма. Также снижается жизнеспособность печеночных клеток, появляются очаги некроза (С.В. Оковитый и др., 2007).

В качестве вторичного процесса токсическая дистрофия печени развивается вследствие острых инфекционных болезней, гастритов, энтеритов, эндометритов, септических процессов.

В патогенезе жирового гепатоза отмечаются следующих моментов: увеличенное поступление в печень и накоплении в гепатоцитах жирных кислот и их предшественников, и повышение скорости синтеза триглицеридов в печеночных клетках, нарушение механизмов удаления триглицеридов из органа. Однако жировой гепатоз развивается только в том случае, если поступление жирных кислот превышает способность гепатоцитов их перерабатывать и выполнять выведение в кровь в составе триглицеридов (И.А. Нукулин, Г.Е. Копытина, М.Н. Кочура, 2008). Такие процессы наблюдаются при липолизе в жировой ткани, при кетозе, сахарном диабете, голодании. Также, если в кормах присутствует избыточное количество жиров и углеводов, животное перекармливается, то запускается интенсивное производство жирных кислот и триглицеридов в печени (В.А. Мищенко, А.В. Мищенко, 2015). Вместе с усиленной продукцией триглицеридов, возникающее вследствие подавления образования жирных кислот, угнетается и синтез в печени липопротеидов – основной транспортной формы триглицеридов из клеток печени. Также при поступлении в печень гепатотропных ядов угнетается синтез апопротеина – белка, который входит в состав липопротеидов, что также тормозит транспорт последних и способствует накоплению данных веществ в гепатоцитах (Е.В. Кузьминова, И.С. Жолобова, А.Г. Зафириди, 2006). Накопление жира в клетках печени становится причиной пролиферации звёздчатых эндотелиоцитов, вовлечения в патологический процесс других тканей органа, наступления некроза клеток. Максимальная интенсивность некроза отмечается при остром течении

токсической дистрофии печени (Н.И. Кузнецов, 1995). Дальнейшим этапом становится нарушение желчеобразования и желчевыделения, белковообразовательной, углеводосинтезирующей, барьерной и других функций печени (О.Я. Карташова, Л.А. Максимова, 2000).

При остром жировом гепатозе из клинических признаков отмечают угнетение общего состояния, праенхиматозную желтуху, потерю аппетита. Температура тела субфебрильная. Отмечается нарушение перистальтики желудочно-кишечного тракта, редко регистрируются колики, если ярко выражен токсикоз – печеночная кома. Печень увеличена в размере, консистенция мягкая (И.И. Калужный, Н.Д. Баринов, А.В. Коробов, 2010, Р.А. Мерзленко, 2012, 2013). Болезненность не присутствует, увеличение селезенки не происходит. При биохимическом исследовании крови отмечают снижение концентрации глюкозы, увеличение концентрации пировиноградной и молочной кислот, билирубина, увеличена активность индикаторных ферментов печени – аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа (А.А. Кириллов, П.Н. Юшманов, А.Я. Батраков, 2015).

При амилоидозе характерно исхудание, бледность слизистых оболочек, нарушение пищеварения. Печень увеличена в размере, гладкая, болезненность отсутствует, консистенция плотная, селезенка увеличенная (Д.О. Коваленко, 2012).

Симптомы хронического гепатоза выражены слабо. Наблюдают угнетение, слабость, отсутствие аппетита, наличие диспепсии. Печень умеренно увеличенная, ее поверхность гладкая, присутствует болезненность при пальпации или перкуссии. Желтушность не проявляется, температура тела соответствует физиологической норме (Е.В. Душкин, 2012).

При патологоанатомическом исследовании отмечаются следующие изменения, которые зависят от вида гепатоза, однако в большинстве случаев связаны с дистрофическими изменениями различной степени выраженности. Патологический процесс захватывает периферическую часть печеночной дольки (перилобулярная дистрофия), центральную часть (центролобулярная дистрофия)

или поражается вся доля печени (диффузная дистрофия). Изменения обратимы, если сохраняется строма органа (В.И. Десятник, 1990). Если поражения глубокие, то наступает печеночная кома. При длительном течении болезни отмечается на вскрытии репаративная регенерация, фиброз и цирроз органа (В.И. Десятник, А.В. Жаров, Т.В. Александрова, 2000).

Диагноз ставится комплексно с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков, результатов лабораторных исследований, результатов патологоанатомического вскрытия, анализа рационов животного. При дифференциальной диагностике необходимо различать острый жировой гепатоз и острый гепатит. При гепатите отмечается увеличение селезенки, а при гепатозе – не наблюдается данных изменений (В.Н. Денисенко, 2002). При помощи биопсии устанавливают жировую инфильтрацию печени, но чаще данное заболевание диагностируют на основе клинических признаков. В большинстве случаев прогноз – благоприятный, жировая инфильтрация устраняется, если проводить эффективное лечение причины заболевания. Однако, когда происходит прогрессирование патологического процесса, развивается стеатогепатит, затем фиброз, появляется цирроз. Причина развития вышеописанного осложнения не ясна. Предположительно процесс связан с оксидативным стрессом (Н.Б. Демина, Н.К. Луняк, А.А. Бабанов, Д.В. Виноградов, 2007).

Как правило течение острого жирового гепатоза сопровождается тяжёлой печёночной недостаточностью, которая впоследствии приводит к гибели животных. В случае хронического течения заболевания, при своевременном устранении причины и начала соответствующей терапии, наступает выздоровление. Следует отметить, что при определенных обстоятельствах острый жировой гепатоз переходит в хронический, а последний может стать причиной развития цирроза (Е.В. Душкин, 2010).

Другим распространённым заболеванием печени у собак является врожденные портосистемные сосудистые аномалии, представленные чаще всего врожденными или приобретенными портосистемными (портокавальными) шунтами (L.W. Weber [et al.], 2003). Реже встречается гипоплазия портальной

вены, также называемая микроваскулярная дисплазия или нецирротическая портальная гипертензия, и артериовенозная фистула. Внепеченочные врожденные портосистемные шунты чаще встречаются у собак мелких пород, в то время как внутripеченочные шунты встречаются у собак крупных пород. В литературе приводятся данные, что многие породы подвержены развитию портосистемных сосудистых аномалий, также существуют варианты, какая из пород более всего находится в группе риска, в зависимости от страны, приводящей статистику зарегистрированных случаев. Чаще упоминаются: Йоркшерский терьер, другие терьеры, Мальтийский и Мини шнауцер (M. Ranson [et al.], 2002).

Распространенным вторичным заболеванием печени у собак являются вакуолярные гепатопатии. Вакуолизация гепатоцитов у собак чаще всего связана с накоплением гликогена. Чаще всего вышеуказанный процесс индуцируется под воздействием глюкокортикоидов и, следовательно, связан с гипердреноркортицизмом или длительным лечением глюкокортикоидами. Очень редко у собак встречается жировая инфильтрация печени (стеатоз), являющаяся вторичным последствием на фоне сахарного диабета (I. Apalkova, 2012). В ретроспективном анализе среди животных, с гистологически подтвержденным диагнозом вакуолиризации гепатоцитов было установлено, что у 55% собак было зарегистрировано явное воздействие глюкокортикоидов. У остальных, видимо, развивалась вызванная стрессом или другим заболеванием гиперкортиземия (I. Apalkova, 2012).

У кошек чаще всего отмечается холангит и печеночный липидоз. Холангит – воспаление желчного тракта, иногда переходит в холангиогепатит, поражая в частности и печень. Заболевание может носить тип острого нейтрофильного или хронического лимфоцитарного (M. Ranson [et al.], 2002). Наиболее частая причина возникновения – бактериальная инфекция, восходящая из кишечника. Печеночный липидоз вызван мобилизацией периферических жиров и возникает при длительном голодании и истощении. Накопление жира может первичным или вторичным, чаще встречается у кошек с избыточным весом. Паренхиматозные заболевания и сосудистые аномалии также редки (I. Apalkova, 2012).

Заболевание желчевыводящих путей, кроме холангита, может встречаться как у собак, так и у кошек. Внепеченочная обструкция желчных путей может быть вызвана внепротоковыми (панкреатит, неоплазия) и внутрипротоковыми (желчекаменная болезнь) причинами, что приводит к тяжелому холестазу в печени (В.И. Десятник, 1990).

Заболевания желчных путей у собак чаще всего проявляется дискинезией, холециститом, желчнокаменной болезнью и опухолями. Долгое время первичные заболевания желчных протоков протекают бессимптомно, но поскольку нарушается экскреция желчи, может развиваться обтурационная желтуха, которая как правило сопровождается синдромами холемии и ахолии.

Холемиа – комплекс нарушений, которые возникают с появлением в крови основных компонентов желчи – желчных кислот, билирубина, холестерина, сопровождающихся желтушным окрашиванием кожи, зудом, снижением частоты сердечных сокращений (В.В. Давыдов, И.В. Захарченко, В.Г. Овсянников, 2004).

Ахолия представляет собой симптом комплекс, который возникает в результате нарушения поступления желчи в кишечник, и сопровождается стеатореей, обесцвечиванием кала, метеоризмом, запорами и геморрагическим синдромом (Д.В. Гарбузенко, 2008).

Под понятием дискинезии желчных путей понимают снижение тонуса, сократимости желчного пузыря и сфинктеров билиарной системы. Дискинезия может быть, как первичным, так и вторичным процессом. Для собак более характерны вторичные дискинезии на фоне органических поражений желчных путей и прочих отделов желудочно-кишечного тракта, почек и других органов брюшной полости. Если вовремя будут удалены факторы, вызвавшие дискинезию – процесс будет остановлен без возникновения осложнений (С.Н. Власова, И.А. Переслечина, Е.И. Шабунина, 1993).

Холецистит – воспаление желчного пузыря, холангит – воспаление желчных протоков. Чаще всего заболевания протекают параллельно, преимущественно поражается или желчный пузырь или желчные протоки. Холангит следует рассматривать как второе наиболее распространенное заболевание печени у

кошек после идиопатического печёночного липидоза. В случае, если липидоз не характерен для определенного региона, то на первое место выступает холангит (В.Н. Денисенко, 2002).

Воспалительный процесс может протекать либо остро, либо хронически. Острое воспаление скорее всего связано с инфекционными процессами в кишечнике и приводят к холестазу и желтухе. Этиология хронического заболевания до конца не изучена. Но есть данные, что кишечная инфекция не играет роли в развитии данной патологии.

Микрофлора может проникать в желчные ходы и желчный пузырь из кишечника, реже из печени, куда бактерии заносятся током крови или лимфы. Течения холецистита и холангита сопровождается холестазом, в которого изменяются химические свойства желчи. В стенке желчных протоков и желчного пузыря возможно возникновение катарального, гнойного или смешанного воспаления. Часто холециститу и холангиту сопутствует желчекаменная болезнь (А.В. Жаров, В.Д. Илеиш, 1996).

Из клинических признаков у больных животных отмечают: болезненность в области печени, рвота, диарея, отсутствие характерного блеска шерстного покрова. Для некоторых собак выявляют дерматологическое проявление: кожный зуд, кожные сыпи (первичные и/или вторичные), алопеции – животных (А.В. Жаров, Ю.П. Жарова, 2012).

В сыворотке крови собак, у которых зарегистрирован холецистит, при биохимическом исследовании отмечают повышение активности щелочной фосфатазы, увеличение концентрации общего и связанного билирубина, в то время как концентрация альбуминов снижается. Коэффициент де Ритиса увеличивается по причине увеличения активности фермента аспаратаминотрансферазы (Е.А. Кесарева, В.Н. Денисенко, 2004).

При ультразвуковом исследовании печени собак и кошек с диагнозом «холецистит» отмечают увеличение размеров желчного пузыря и повышение эхогенности его стенок. Последний факт и неоднородность паренхимы являются

признаком одновременного проявления холецистита и гепатита (О.Я. Карташова, Л.А. Максимова, 2000).

Хроническое течение холецистита сопровождается увеличением или уменьшением размеров желчного пузыря, изменением его формы, его стенки утолщаются или деформируются.

Воспалительный процесс в желчных путях может являться фактором, который становится причиной образования камней. Также патологический процесс может распространяться и на паренхиму печени (И.И. Калюжный, 2007).

При желчекаменной болезни отмечается образование камней в желчном пузыре и протоках печени, затрудняющих или препятствующих поступлению желчи в кишечник. Образование камней в желчном пузыре встречается у собак достаточно редко, их чаще всего обнаруживают случайно при проведении операций в брюшной полости (В.Н. Денисенко, 2002). Следует предполагать наличие камней при неспецифических явлениях таких как рвота, повышение активности щелочной фосфатазы и нормальных значений трансаминаз (В.С. Камышников, 2005). Для подтверждения диагноза рекомендуют проведение холецистография. В целом болезнь протекает длительно и бессимптомно. При хронической форме холецистита камни образуются в желчном пузыре, что объясняется кристаллизацией желчных кислот вследствие нарушения структуры коллоидов желчи (Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров, 2005).

Из клинических симптомов при желчекаменной болезни отмечены спазмы желчного пузыря. При механической закупорке желчного протока камнями проявляется механическая желтуха и печеночная колика (Н.И. Кузнецов и др., 1998).

Ультразвук исследование выявляет деформацию желчного пузыря, утолщение его стенок. В полости желчного пузыря обнаруживают эхопозитивные участки, дающие эхонегативную «дорожку» (Н. Блуаз-Бриде, 1999).

Таким образом, при всем многообразии этиопатогенетических механизмов развития патологических процессов в печени, основные звенья патогенеза по большей части универсальны. Это позволяет использовать достаточно близкую

патогенетическую терапию поражений гепатобилиарной системы. Основу, которой могут составлять лекарственные средства с направленным действием на печеночные клетки.

2.2 Лекарственные средства, применяемые для коррекции патологических состояний печени у животных

Многочисленные функции печени предполагают, что нарушение любого типа обмена веществ повлечет за собой поражение клеток или развитие иного, более тяжелого патологического процесса, или возникновением осложнений основного заболевания. Также следует отметить, что у больных животных отмечается возникновение интоксикации, приводящей к гибели молодняка животных (Ш.М. Абдуллаев, 1985; Ю.Н. Алехин, 2004).

Таким образом актуальным является поиск новых средств, способных повышать устойчивость печени к различного рода негативным воздействиям, способствующих усилению детоксикационной функции, которое обуславливается повышением активности ферментов цитолиза и цитохрома Р-450, которые восстанавливают функции печени (А.И. Венгеровский, И.В. Маркова, 1999).

Существующие в ветеринарной практике гепатопротекторные средства обладают антиоксидантным действием и стимуляцией антиоксидантных систем клеток печени, что и является основной причиной, объясняющей их фармакологическое действие (Н.Б. Демина, 2007).

Применение гепатопротекторных средств ведет к устранению ключевых механизмов и изменений, повреждающих орган: ингибируются процессы фосфолиполиза, уменьшается содержание липофосфатидов, восстанавливается оптимальная структура мембран, нормализуются процессы депонирования ионов Ca^{2+} , восстанавливается барьерная функция мембран митохондрий, эндоплазматического ретикулума и лизосом. Нормализуется обмен белков, липидов, углеводов. Возвращаются к физиологической норме основные функции печени, такие как антитоксическую, экскреторную и другие. Снижается

активность основных печеночных ферментов, преобладают процессы регенерации поврежденных участков (Л.Р. Королева, 2005).

На данный момент не существует общепринятой классификации гепатопротекторных средств, однако в практике руководствуются следующим распределением: препараты растительного происхождения, препараты животного происхождения, препараты, содержащие эссенциальные фосфолипиды, аминокислоты или их производные, витамины или витаминоподобные соединения, препараты других групп (Н.И. Кузнецов, 1995).

Эффективность антиоксидантных фармакологических средств объясняется тем, что продукты перекисного окисления липидов обуславливают практически все механизмы повреждения гепатоцитов, а также прогрессирование патологий печени хронического характера (А.В. Halim, 1997). Наиболее токсичные продукты ПОЛ радикалы инактивируются благодаря действию биологических антиоксидантов и антиоксидантных систем организма (Б. Е. Меньщикова [и др.], 2005). К биологическим антиоксидантам относятся фенольные антиоксиданты – альфа-токоферол, полифенолы, флавоноиды, жирорастворимые витамины. Серосодержащие аминокислоты – цистеин и метионин, витамины А и С, бета-каротин также принимают участие в удалении свободных радикалов (В.Г. Макаров, Н.М. Макарова, А.И. Селезнева, 2005).

Среди всех препаратов чаще всего используются растительные средства (54%), на втором месте находятся синтетические препараты и препараты аминокислот (30%). На долю фосфолипидных лекарственных средств приходится 16% от общего количества «истинных» гепатопротекторов (В.С. Моисеев, 2008).

В настоящее время ведутся активные исследования гепатопротекторных и антиоксидантных свойств различных продуктов растительного происхождения (И.Г. Никитин, 2007). Наиболее распространенным растительным веществом с доказанным гепатопротекторным действием является силимарин, представляющий собой комплекс флавоноидов. К другим гепатопротекторным растительным средствам относятся глицирризин, экстракт листьев артишока,

масло семян тыквы, многокомпонентные препараты из индийских и китайских трав (С.М. Николаев, 1992).

Одним веществом является экстракт солодки (*Glycyrrhiza glabra*) – глицирризин. Глицирризин представляет собой конъюгат глюкуроновой и глицирретиновой кислоты. Также присутствуют флавооиды, изофлавоиды, кумарины, триперпеноиды и фитостеролы (И.А. Никулин и др., 1999). В исследованиях на лабораторных животных было установлено антиоксидантное действие, влияние на печеночные ферменты (вызывает снижение активности печеночных ферментов), уменьшает выраженность фиброза печени. Предположительно вещества экстрактов солодки действуют на ядерный фактор каппа В, вызывают ингибирование фактора некроза опухолей (ФНО), индуцирует образование интерферонов и подавление секреции поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) (С.В. Оковитый и др., 2010).

Благодаря наличию в экстракте из листьев артишока фенолоокислоскислот (кофейной, хлорогеновой и так далее) флавоноидов и сесквитерпенлактона данное растительное сырье имеет потенциал являться гепатопротекторным препаратом. Также имеются данные, что положительное действие оказывает и соединение цинарин. Помимо прочего в экстракте содержатся еще и каротины, витамины С, группы В, инулин (В.М. Покровский, О.Г. Компаниец, 2008). Доказано влияние препарата на активность печеночных клеток. Кроме того, соединение оказывает стимулирующий эффект на выработку ферментов, что обуславливает влияние на липидный обмен в печени, улучшение ее антитоксической деятельности (М.Мажевска, Н. Сзeczот, 2009). Имеются данные, что экстракт листьев артишока нормализуют концентрацию холестерина в крови, если наблюдается изначально избыточное содержание соединения (L.H. Jiunn, L.H.Y. Anthony, 1997). Отмечается наличие желчегонного эффекта за счет умеренного холеретического и слабого холекинетического эффекта. Вещество, полученное из листьев артишока малотоксично. Его рекомендуют применять даже при токсических гепатитах и циррозе печени (E.S. Haskett, D.C. Twedt, D.L. Gustafson, 2013).

Гепатозащитное действие описано у масла, получаемого из семян тыквы, что связано с входящими в его состав полиненасыщенными и ненасыщенными жирными кислотами с высокой долей линолевой и олеиновой кислот, а также присутствием различных изомеров токоферола, высоким содержанием бета-каротина и других каротиноидов, высокой концентрации эфирных масел, стеролов, водорастворимых витаминов (витамин С, витамины группы В) (М.Мajewska, Н. Czeczot, 2009). Масло семян тыквы рекомендуется применять при хронических заболеваниях печени, но данный препарат не может широко применяться, поскольку отсутствует доказательная база его клинической эффективности (В.Фубини, М.Р. Гаско, М. Галларате, 1989).

Также предполагается, что L- орнитин-L-аспартат обладает некоторым гепатозащитным эффектом. Данное соединение подвергается в кишечнике диссоциации с получением аминокислот орнитина и аспартата (D.L. Iden, Т.М. Allen, 2001). Полученные соединения принимают участие в обмене веществ в печеночных клетках, являются элементами образования мочевины, участвуют в обезвреживании аммиака. В свою очередь аспартат принимает участие в синтезе глутамина, связывает аммиак в тканях, в особенности при нарушении дезинтоксикационной функции печени. Имеются данные о выраженном эффекте при терапии печеночной энцефалопатии (D.L. Iden, Т.М. Allen, 2001).

Метадоксин. Данное вещество было впервые зарегистрировано в 1984 г в Италии. Метадоксин является предшественником глутатиона, чем объясняется его антиоксидантное действие. Также отмечается выраженное холинергическое действие на центральную нервную систему (ЦНС), повышением концентрации дофамина и снижением концентрации глутамата. К недостаткам применения данного соединения относят отсутствие доказательной базы эффективности при гепатопатиях (U. Małolepsza, Н. Urbanek, 2000).

Эссенциальные фосфолипиды. Клеточные мембраны печеночных клеток, как и других клеток в организме, большей частью состоят из фосфолипидов. Фосфолипиды также принимают участие в процессах молекулярного транспорта, деления, дифференциации, стимуляции различных ферментативных систем.

Повреждения цитоплазматической мембраны клеток вызываются различными патогенными веществами, что является причиной нарушения жизнедеятельности клетки, иное течение процессов метаболизма (K.R.Morris [et al.], 2001). Предполагается, что эссенциальные фосфолипиды экзогенно способны восполнять недостаток поврежденных элементов клетки, а также стабилизации клеточной мембраны и снижение процессов цитолиза – молекулы ЭФЛ встраиваются в фосфолипидный бислой повреждённых гепатоцитов, что приводит к восстановлению его барьерной функции ((K.R.Morris [et al.], 2001). Также имеются сведения и об антиоксидантном действии препаратов на основе ЭФЛ, поскольку фосфолипиды способны участвовать в процессах ПОЛ. В 2001 году было выполнено 106 экспериментов с 30 различными типами моделей на 7 различных видах животных (В.В. Удут, А.И. Венгеровский, А.М. Дыгай, 2012). Главным образом рассматривали эффективность ЭФЛ при химической и лекарственной интоксикации, такая как интоксикация тетрахлоридом углерода, интоксикация, вызванная длительным приемом этанола или органических растворителей, парацетомола, тетрациклина и индометацина ((K.R.Morris et al., 2001) При оценке эффективности ЭФЛ в вышеописанных экспериментах, которые были проведены *in vivo*, было установлено, что на микроскопическом уровне выявлялись нормальные или близкие к физиологической норме структурные элементы мембран и органелл. Отмечалось уменьшение или полное отсутствие жировой дистрофии гепатоцитов, а также уменьшение или отсутствие некроза клеток (С.В. Оковитый, Д.С. Суханов, М.Г. Романцов, 2012). На фоне проводимой терапии ЭФЛ улучшались биохимические показатели, в частности снижалась активность печеночных трансаминаз. Улучшался метаболизм клетки. Клетки печени активно регенирировались, уменьшалось образование соединительной ткани. В России ЭФЛ часто применяются в терапии, однако в Европейском Союзе и США препараты данной группы не используются в клинической практике, основываясь на результатах рандомизированных плацебо-контролируемых исследованиях (в частности Veterans Affairs cooperative study, не подтвердившие положительное влияние препаратов на основе ЭФЛ на функции печени по

сравнению с плацебо). В качестве лекарственного препарата ЭФЛ зарегистрированы только в странах СНГ, тогда как во всем мире они представлены на рынке в качестве биологически активных добавок (С.В. Оковитый, 2010). Таким образом, можно сказать, что из явных преимуществ у препаратов на основе ЭФЛ присутствует снижение синдрома цитолиза и опосредованное антифибротическое действие (И.А. Никулин и др.,1999) Из недостатков же отмечают невозможность стабильно снижать воспалительный процесс в гепатоците путем замещения поврежденных фосфолипидов в мембране, поскольку повреждение может быть связано со взаимодействием клетки с иммунными комплексами, аутоантителами и так далее. Отсутствие доказательств получения фосфолипидов гепатоцитами и процессов встраивание фосфолипидов в мембраны клеток печени (В.С. Моисеев, 2008). При приеме ЭФЛ перорально препарат обладает низкой биодоступностью, поскольку фосфолипиды в составе хиломикроннов поступают в лимфатическую систему, а не в печень. По лимфатической системе они транспортируются в жировую ткань организма, где депонируются и метаболизируются (Г.К. Мироджов, 2005). В случае парентерального введения ЭФЛ распространяются по всему организму, могут накапливаться в различных органах и тканях, не достигая печени (М.Д. Машковский, 2010).

Следующая группа гепатопротекторных препаратов представлена аминокислотами или их производными. К этой группе препаратов относятся лекарственные средства на основе адеметионина. Адеметионин – природное вещество, эндогенное синтезируемое из метионина и аденозина. Впервые вышеназванное соединение было описано в 1952 году итальянцем Кантони (J.Hodgson, 2001).

В организме, являясь коферментом, адеметионин является переносчиком метильных групп. Более сорока метаболических реакций требуют переноса метильной группы от S- аденозилметионина на такие субстраты, как нуклеиновые кислоты, белки и так далее (L.H. Jiunn, L.H.Y. Anthony, 1997). Большая часть фермента синтезируется в печени под действием фермента аденозилтрансферазы.

В организме метаболизм адеметионина входит в так называемый SAM- цикл. На первом этапе SAM-зависимая метилтрансфераза, использующая конечное соединение в качестве субстрата, образует S-аденозилгомоцистеин. Последний претерпевает превращения и распадается на гомоцистеин и аденозин под действием фермента S-аденозилгомоцистеин гидролазы (Liu M. Y. et al., 2010). Затем происходит реакция переноса метильной группы от 5-метилтетрагидрофолата, в результате которой гомоцистеин превращается в метионин. Далее метионин может обратно превратиться в адеметионин, завершив цикл (L.Van Zuylen, J.Verweij, A.Sparreboom, 2001).

При синтезе эндогенных фосфолипидов важным этапом является реакция трансметилирования. Нарушения в процессах транссульфирования приводит к недостатку глутатиона, что ведет к снижению устойчивости гепатоцитов против воздействия свободных радикалов. Кроме того, адеметионин является предшественником ряда тиоловых соединений. Экспериментально доказано антиоксидантное и противотоксическое действие адеметионина, его положительное влияние на процессы регенерации печеночной ткани, препятствие развитию фиброза. Также отмечено, что адеметионин принимает активное участие в метаболизме ксенобиотиков. Явным преимуществом адеметионина является способность оказывать выраженное гепатозащитное действие практически при любой патологии печени, а также при развитии синдрома холестаза и высоком уровне цитолиза.

В исследованиях, проведенных L.Van Zuylen, J.Verweij, A.Sparreboom, 2001 была показана способность соединения снижать литогенный свойства желчи. В вышеописанной работе основным критерием служил индекс насыщения желчи холестерином. Однако наилучшую эффективность адеметионин показывает при терапии токсических гепатитов при парентеральном введении. В ходе наблюдения за пациентами отмечалось наличие антидепрессивного действия, которое развивалось к 5-7 дню от начала терапии (A.I. Vengerovskiy [et al.], 1999). При развитии внутрипеченочного холестаза угнетается активность S-аденозилметил-синтетазы а также продукция S-адеметионина, что

сопровождается нарушением биохимических процессов в гепатоцитах. Происходящие изменения приводят к снижению фосфолипидов, падает активность АТФазы и других белков, выполняющих транспортные функции, ухудшается текучесть мембраны, захват и выведение компонентов желчи, истощаются внутриклеточные запасы тиолов и сульфатов, которые выполняют в клетке антиоксидантные функции, являются главными субстанциями в процессах детоксикации ксенобиотиков, образующихся в организме или поступающих извне (Э.С. Токаев, Н.П. Блохина, Е.А. Некрасов, 2007). При недостатке данных соединений развиваются процессы цитолиза печеночных клеток при холестазах любого генеза. При восполнении недостатка адеметионина и индукции его синтеза в организме, пациенты с диффузными заболеваниями печени, такими как цирроз и гепатит, с синдромами внутрипеченочного холестаза применение синтетических аналогов адеметионина значительно меняет результаты биохимических показателей: снижается активность индикаторных ферментов (щелочной фосфатазы, аминотрансфераз), снижается концентрация прямого билирубина. При этом следует отметить, что выраженный холеретический и гепатопротективный эффекты сохраняются до 3 месяцев после окончания курса терапии (Б.В. Уша и др., 2012).

Из недостатков данного лекарственного средства следует отметить, что при оральном применении обладает низкой биодоступностью, максимальная эффективность обеспечивается только при парентеральном введении. Соединение является химически нестабильным, имеет маленький срок хранения, веществу свойственно распадаться при хранении. Применение при терапии у сельскохозяйственных животных экономически невыгодно (А.И. Vengerovski [et al.], 1999).

Урсодезоксихолевая кислота (УДХК). УДХК – гидрофильная, не обладающая токсичным эффектом желчная кислота, которая образуется под воздействием бактериальных ферментов из 7-кето-литохолевой кислоты, поступающей в печень из тонкого кишечника. Положительным эффектом считается снижение внутрипеченочной циркуляции гидрофобных желчных

кислот, что препятствует их токсическому воздействию на мембраны печеночных клеток и клеток эпителия желчных протоков. Отмечается наличие антиоксидантного действия УДХК (С.О.Rangel-Yagui, A. Jr. Pessoa, L.C.Tavares, 2005). Влияние УДХК на организм обусловлено многими причинами, некоторые из которых еще не изучены. На сегодняшний день возможно оперировать данными, что УДХК обладает гепатопротекторной, антихолестатической, иммуномодулирующей, гипохолестеринемической, литолитической и антиапоптотической эффективностью. Препарат показал положительное действие при терапии острых и хронических гепатитов различной этиологии. Применение УДХК рекомендуется при заболеваниях печени, которые сопровождаются или вызываются холестазами (М. Ranson [et al.], 2002).

УДХК оказывает желчегонное действие, уменьшает синтез холестерина, его всасывание в кишечнике. Также снижается его концентрация в желчи. УДХК улучшает растворимость холестерина в желчевыводящей системе, а также является стимулятором образования и выведения желчи. Под воздействием УДХК снижаются литогенные свойства желчи, увеличивается количество желчных кислот в ней (Ю.Н. Петрушенко, 2007). Отмечается усиленная желудочная и панкреатическая секреция. Возможно полное или частичное растворение холестериновых камней, если препарат применяется энтерально. Препарат способен влиять на иммунные реакции в печени: изменяется продукция ИЛ-2, количество Т-лимфоцитов, экспрессия некоторых антигенов, происходящая на мембране гепатоцитов, уменьшается (А.М. Самотин, 2002).

Проводились исследования эффективности УДХК при индуцированном поражении печени этанолом. Лучшие результаты продемонстрировали больные, принимающие УДХК вместе с силимарином. Изучения приемлемой дозировки и методик применения активно изучаются (С.В. Оковитый, Д.С. Суханов, М.Г. Романцов, 2012).

Известно, что патологии печени могут быть индуцированы также недостатком в рационе различных микроэлементов. Однако наибольшее значение

в этом вопросе отводится ультрамикроэлементу – селену (S.M. Lippman, 2005; Y. Mehdi, I. Dufrasne, 2005; M.Richelle [et al.], 2006).

Присутствуя в организме в микроколичествах, микронутриенты участвуют в образовании ферментов, влияют на их активность, принимают участие в синтезе и процессах метаболизма гормонов, витаминов, оказывают влияние на нервную, сердечнососудистую, эндокринную системы, деятельность желез внутренней секреции, желудочно-кишечный тракт. При помощи минеральных веществ связывается и доставляется тканям кислород, выводится углекислый газ, поддерживается слабощелочная реакция крови и кислотно-щелочное равновесие, от концентрации макро- и микроэлементов зависит водный, белковый, углеводный и липидный обмены, микроэлементы способствуют обезвреживанию токсинов. Недостаток микроэлементов имеет значение в патогенезе ряда заболеваний инфекционной и неинфекционной этиологии (U.Tinggi, 2008; M. Vinceti [et al.], 2014; W.P. Weiss. 2003; M.W. Yu et al.,1999; U.Lindh, A. Danersund , A. Lindvall, 1996; Lars-Oliver Klotz et al., 2003).

Селен является важнейшим ультрамикроэлементом, недостаток которого в питании животных и человека может приводить к ряду заболеваний. Роль селена как важного питательного элемента для млекопитающих изучена Schwarz and Folz в 1957 г., когда в эксперименте *in vivo* обнаружили, что он ингибирует индуцированный некроз печени у крыс. Позднее, J.T. Rotruck в 1973 г. было доказано, что селен является неотъемлемой частью глутатионпероксидазы (в связанной с белком форме аминокислоты селеноцистеина) – фермента, разрушающего гидропероксида и, таким образом, защищающего мембранные липиды и другие клеточные компоненты от окислительного повреждения свободными радикалами. Селен оказывает влияние на обмен лейкотриена, тромбоксана и простаглицлина. Дефицит селена подавляет реакции иммунной защиты, в особенности неспецифической, клеточного и гуморального иммунитета. Также доказано, что селен является необходимым компонентом I типа йод-тиронин-5-дейодиназы. По данным A. Drutel [et al.], 2013г., недостаток селена вызывает снижение активности дейодиназы, тем самым способствуя

развитию гипотериоза. Кроме того, в плазме крови выделен ряд селенопротеинов, одним из которых является белок Р. Предполагается, что белок Р является транспортным и защищает организм от свободно-радикальных процессов. Наиболее исследовано положительное влияние селена при лечении рака, гепатита С, цереброваскулярной недостаточности, болезни Альцгеймера, отравлений солями тяжелых металлов, болезней щитовидной железы (А. Drutel [et al.], 2013), сердечно-сосудистых заболеваний и астмы.

В отношении животноводства наибольшее значение имеет вызываемое дефицитом селена заболевание – беломышечная болезнь, характеризующаяся глубоким нарушением метаболизма, сопровождающаяся дистрофическими, функциональными и некробиотическими процессами в скелетной и сердечной мускулатуре, сосудах, а также различных органах и тканях (Е.А Klein et al., 2000; Р.Р. Hoffman, М.Ј. Berry, 2008; К.Е. Hill [et al.], 2003). Наиболее подвержены заболеванию молодняк сельскохозяйственных животных – в первые две недели после рождения и последующие 2-3 месяца жизни (у птиц – в возрасте 2-3 недель, иногда – 6-10 дней). У животных старшего возраста чаще протекает в скрытой форме. Заболевание носит массовый характер и причиняет значимый экономический ущерб (S.Dhingra, М.Р.Вansal, 2006; М. Brinkman [et al.], 2006)

Таким образом поиск способов и средств восполнения дефицита селена в питании животных является актуальной проблемой, решение которой позволит повысить уровень продуктивности животных на 20-30% (В.А. Беляев, 2009, А. Drutel [et al.], 2013).

В отношении коллоидного раствора селена в современной литературе встречаются только единичные публикации, которые в основном рассматривают эту структуру как биоактивную добавку. Интересна в этом отношении работа сотрудников иранского департамента фармацевтики и биотехнологии. Авторы считают, что восстановление лейкоцитов, которое наблюдалось после орального приема селеновых наночастиц у облученных мышей, может быть очень интересным и способно обеспечить клеточный иммунитет против

злокачественных заболеваний или другой бактериальной, или грибковой инфекции после лучевой терапии (P.Brenneisen, H.Steinbrenner, H.Sies, 2005).

С момента открытия селена в качестве важного компонента антиоксидантных ферментов, таких как глутатионпероксидазы (GPx), тиоредоксинредуктазы (TrxR) и йодтиронин дейодиназ (IDD), резко возрос интерес к изучению других Se-содержащих белков (селенопротеинов) или ферментов (селеноэнзимов). На данный момент выявлено по крайней мере 30 селенопротеинов, которые выделены у млекопитающих. Из-за их антиоксидантной активности, наблюдается огромный интерес к изучению селена и его соединений в химиопрофилактике рака, болезней сердца, иммунологической реактивности (В.В. Пронин, 2010, Bo Huang, Jinsong Zhang, Jingwu Hou, Chang Chen, 2003; C. Benstoem [et al.],2015; N.M. Al-Rasheed, 2013).

Соединения селена как органические (селеноцистеин, селенометионин), так и неорганические (селенит, селенат) в организме достаточно свободно подвергаются метаболизму (P. Brenneisen, 2005). Селен включается в биосинтез селеноцистеина, который является основным компонентом антиоксидантных ферментов. Снижение антиоксидантных систем в организме ведет в первую очередь к накоплению перекисей, оказывающих повреждающее действие на клетки организма (P.Brenneisen, H.Steinbrenner, H.Sies, 2005, И.В. Киреев 2013).

Увеличение в организме активных форм кислорода оказывает окислительный стресс в физиологической системе, что приводит к образованию перекисей и в первую очередь повышению перекисного окисления липидов. Активные формы кислорода играют ведущую роль в патогенезе заболеваний сердечно-сосудистой системы таких как гипертоническая болезнь, атеросклероз, гипертрофия сердца и сердечная недостаточность. Вместе с этим установлено, что селен содержащий фермент тиоредоксинредуктаза препятствует развитию атеросклеротических процессов в организме животных путем снижения гиперхолестеринемии, перекисного окисления липидов и инактивации оксида азота. Так в исследованиях S. Dhingra, M.P. Bansal, (2006) на животных, установлено, что дефицит селена в организме коррелирует прямо

пропорционально с концентрацией холестерина в крови лабораторных мышей. Это напрямую указывает, что селен принимает непосредственное участие в регулировании обмена холестерина в организме, тем самым препятствуя развитию атеросклеротических изменений (К.Е. Hill [et al.], 2003).

Наряду с этим в последнее время широко позиционируется противораковая эффективность селен содержащих соединений. Многочисленные исследования на животных подтверждают важную роль селена в профилактике и лечении раковых заболеваний. J. Fleming, A. Ghose, P. Harrison, 2000 установили, что селен *in vitro* подавляет рост клеток и вызывает апоптоз клеток карциномы ротовой полости. Известно, что соединения селена, входящие в состав антиоксидантных систем, предотвращают накопление активных форм кислорода в кожном эпителии. Тем самым препятствуя развитию кожных заболеваний, включая рак. Наряду с этим в исследованиях рядом исследований установлено, что селен препятствует развитию рака предстательной железы (К.К. Шульгин и др., 2008).

Таким образом, лекарственные средства, применяемые в терапии патологий печени должны отвечать следующим требованиям: защищать клетки печени от негативного воздействия повреждающего фактора, стимулировать детоксикационную функцию гепатоцитов, способствовать регенерации гепатоцитов. К таким веществам на наш взгляд относятся флавоноиды расторопши пятнистой (А.С. Щекатихина и др., Н.А. Фердман, 2007; Н.П. Скакун и др., 2007; Ю.П. Балым, В.И. Беляев, С.В. Шабунин, 2007, В.А. Гринь, Т.Н.Родионова, Д.О. Москвичева, 2011, E. Bosisio [et al.], 1992; R. Campos et al., 1989; Gazarik R, D. Walterova, V. Kren, 2007; V. G. Hahn, 1968).

2.3 Препараты на основе экстрактов плодов расторопши пятнистой и их гепатопротекторные свойства

Еще одну группу антиоксидантных веществ, способных выполнять гепатопротекторную функцию, составляют флавоноиды растительного происхождения.

Флавоноиды – метаболиты растений - представляют собой достаточно большую группу биологически активных соединений. Флавоноиды представлены в природе более чем 10000 соединений, многие из которых не изучены до сих пор. В клетках растений они выполняют в основном защитные функции, такие как обеспечение растительной пигментации, обеспечивающей защиту от вредного ультрафиолетового излучения (R. Bouillon, Van S. Cromphaut, G. Carmeliet, 2003). Кроме того, они обладают антиоксидантными, противовирусными и антибактериальными свойствами. Флавоноиды также регулируют экспрессию генов и модулируют ферментативные реакции (J.J. Lah, W. Cui, K.Q. Hu, 2007).

Все встречающиеся в природе флавоноиды имеют три гидроксильные группы, две из которых находятся на кольце А в положениях пять и семь, и одна находится на кольце В, в положение три (P.Letteron [et al.],1990). Биохимическое действие флавоноидов зависит от наличия и расположения у них различных заместителей, которые влияют на метаболизм каждого соединения. Такие заместители могут быть найдены в свободной или связанных формах: агликонов и β-гликозидов (P. Morazzoni, E.Bombardelli,1996). Основные подклассы флавоноидов, основанные на видах их химической структуры, включают в себя: флавоноиды, флавоны, флаванонами, флавонолы, антоцианы и изофлавоны (M.Mourelle [et al.],1989).

Большинство биологически активных компонентов растительного происхождения, используемых в медицине, представляют собой флавоноиды, к которым относятся такие биологически активные вещества как антоцианы из черники, катехины из зеленого чая, силимарин из расторопши (S.A. Tasduq [et al.], 2005). Содержание флавоноидов в плодах расторопши пятнистой по разным данным может составлять от 1,5 до 4%, в зависимости от разновидности и места произрастания (H.Wagner, P.Diesel, M.Seitz, 1974).

При всех имеющихся преимуществах этих соединений, одним из основных минусов является их низкая биодоступность, а, следовательно, и частичное усваивание организмом (K.Wellington, B.Jarvis, 2001). Данный факт может быть объяснен следующими факторами. Во-первых, флавоноиды представляют собой

молекулы с несколькими кольцами, которые являются слишком большими для проникновения через биологические мембраны при помощи простой диффузии, в то время как активный транспорт через клеточные мембраны проходит слабо. Во-вторых, многие молекулы флавоноидов, как правило, имеют плохую растворимость в жирах, что сильно ограничивает их способность проходить через энтероциты тонкого кишечника, имеющих большое количество липидов в составе внешних мембран (H.Wagner, L.Horhammer, R.Munster, 1968).

Силимарин, флавоноид, получаемый из плодов и семян расторопши (*Silybum marianum* L. Gaertn.), и состоит в основном из силибинина ($\approx 90\%$) вместе с небольшими количествами других стереоизомеров, таких как изосилибин, дигидросилибин, силидианин, силикрестин. Силимарин был впервые выделен из расторопши и химически охарактеризован в 1968-1974 группой авторов Wagner H, Diesel P, Seitz M. (H.Wagner, P. Diesel, M. Seitz, 1974). Позже о биохимическом действии силимарина на РНК, белки и синтез ДНК сообщил C. Dehmlow, J. Erhard, H. de Groot, 1996.

Данный флавоноид широко используется в традиционной медицине. Был признан клинический эффект от применения этого соединения при лечении гепатита печени, вызванного этанолом или применением противотуберкулезных препаратов. Силибинин обладает сильным антиоксидантным действием, позволяющим поглощать как свободные радикалы, так и активные формы кислорода (G.Vogel, W.Trost, R.Braatz, 1975). Гепатопротекторная активность силимарина достигается с помощью нескольких механизмов, включая антиокислительное действие, ингибирования перекисного окисления липидов, расширенной детоксикации печени путем ингибирования первой фазы детоксикации и повышения глюкуронидации, а также восстановление концентрации глутатиона в печени (A.I.Vengerovskiy, I.V.Markova, A.S.Saratikov, 1999; S.A. Tasduq [et al.], 2005; G.S. Rathore [et al.], 2011).

Активация монооксигеназной системы печени препаратами расторопши может служить одним из механизмов, объясняющих ее эффективность при терапии токсических поражений печени (В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко,

СЕ. Дмитрук, 1990). Считается, что именно индукция Р-450 цистеином, ацетилцистеином, цистамином лежит в основе инактивации ими гепатотоксинов, таких как четыреххлористый углерод, дихлорэтан, парацетамол (Л.В. Кравченко и др., 2009).

Так же имеются данные о противовоспалительном действии силимарина, которые связаны с подавлением синтеза лейкотриена и простагландинов, игнорированием поражения купферовских клеток, стабилизации тучных клеток и ингибирование миграции нейтрофилов. Кроме того, силимарин, как было показано, увеличивает синтез белка в гепатоцитах, что способствует регенерации печеночной ткани (Л.В. Крепкова, А.А. Шкаренков, Т.А. Сокольская, 2008). Исследования на животных также показали, что силибин снижает конверсию звездчатых клеток печени в миофибробласты, замедляет или даже задерживает развитие фиброза (.Я. Карташова, Л.А. Максимова, 2000).

Антирадикальные свойства силимарина, лежащие в основе его цитопротекторной активности являются основой использования силимарина для предотвращения токсического и канцерогенного действия многих химических веществ не только в печени, но и других органах (Я. Карташова, Л.А. Максимова, 2000). Силибин действует в основном как антиоксидант, защищая ткани против окислительного стресса, который вызывается химиотерапевтическими препаратами и в большей степени снижает гепатотоксический эффект таких средств.

Показано, что силимарин обладает таким же стимулирующим действием на клетки почек (линия Vero, немалигнизированные клетки почек обезьяны) как и на клетки печени. Скорость пролиферации, биосинтез белка и ДНК, активность лактатдегидрогеназы увеличивались в присутствии силибина и силикрстина. Интоксикация клеток почек *in vitro* парацетамолом, цисплатином, винкристином снималась введением силимарина, причем не зависимо от времени введения силимарина – до или после введения лекарств (Н.Ф. Кушнерова [и др.], 2014).

За последние годы описано около 30 классов химических веществ с раково-профилактическим эффектом, которые могут иметь практическое значение в

снижении заболеваемости раком у животных и человека. Среди них все большее внимание уделяется полифенольным антиоксидантам естественно происхождения (Е.В. Луценко [и др.], 2008). Силимарин используется в клинической практике в Европе и Азии для лечения алкогольных заболеваний печени. В качестве лечебного средства, силимарин хорошо переносится и в значительной степени не имеет побочных эффектов, что позволило применять силимарин на рынке в Соединенных Штатах и в Европе в качестве пищевой добавки (В.Г. Макаров, Н.М. Макарова, А.И. Селезнева, 2014).

Проведенные исследования на мышах, крысах, кроликах и собаках, с использованием различных способов введения препарата, показали, что силимарин является нетоксичным в исследованиях общетоксического действия, даже в больших дозах. Кроме того, он нетоксичен, в субхронических и хронических испытаниях и не показывает каких-либо побочных эффектов (Г.Д. Миронова, 2008).

Силибинин увеличивает ацетилирование гистона H3 и H4 *in vitro*, и *in vivo* в клетках линии Huh7 ксенотрансплантатов у голых мышей. В клетках немелкоклеточного рака легкого, силибинин ингибирует активность HDAC и вызывает снижение уровня соединения. Также было показано, что силибинин оказывает анти-пролиферативные и проапоптотические эффекты в первичных клетках аденокарциномы SW480 и в их метастатических производных (Л.В. Кравченко и др., 2009). Перспективными представляются исследования противоопухолевых свойств препаратов расторопши. Была доказана превентивная активность силимарина против развития экспериментальных опухолей. Считается, что антиканцерогенная активность силимарина объясняется его способностью ингибировать эндогенный опухолевый промотер ФНО – альфа (S.A. Tasduq et al., 2005).

Силибинин может быть полезным соединением в химио-профилактики злокачественных опухолей кожи, мочевого пузыря, печени, шейки матки и толстой кишки (W. Cui, F. Gu, K.Q. Hu, 2009). Ценным свойством препаратов расторопши считают их способность предотвращать развитие фиброзной

трансформации ткани печени, что связывают как с повышением клиренса свободных радикалов, так и с непосредственным подавлением ими синтеза коллагена. Важно, что препараты силимарина стимулируют регенерацию печеночной паренхимы, увеличивая в ней концентрацию нуклеиновых кислот и белка (Г.Д. Миронова, 2008).

Наиболее известные растительные флавоноиды, такие как кверцетин и руин, обладают антиоксидантными свойствами. Биофлавоноиды – естественные защитники от «окислительного стресса», вызванного увеличением активности и возрастанием в организме количества свободных радикалов (S.Basu, 2003).

Флавоноиды способны как непосредственно захватывать свободные радикалы, так и участвовать в восстановлении других антиоксидантов. Непосредственное антиоксидантное действие флавоноидов реализуется за счет наличия в их структуре слабых фенольных гидроксильных групп, легко отдающих свой атом водорода при взаимодействии со свободными радикалами. Сами они превращаются в малоактивные феноксильные радикалы (И.В. Шилова и др., 2008).

Прооксидантные и антиоксидантные свойства флавоноидов во многом зависят от их растворимости, концентрации, соотношения окислителей и восстановителей в среде, наличия металлов переменной валентности, рН среды, соотношения скорости взаимодействия флавоноидов с пероксильными радикалами и скорости взаимодействия радикала с жирно-кислотными остатками фосфолипидов и многих других факторов (Э.С. Токаев, Н.П. Блохина, Е.А. Некрасов, 2007; А.С. Щекатихина и др., 2006).

2.4 Повышение биодоступности и терапевтической эффективности лекарственных средств

2.4.1 Создание мицелярных растворов липофильных лекарственных средств

Теперь, когда достигнуто понимание молекулярных механизмов развития патологического процесса, ученые и врачи не удовлетворяются только

необходимым воздействием лекарств на причину заболевания. Встает задача избежать нежелательного побочного действия лекарств на органы и ткани и уменьшить общие побочные эффекты терапии на организм в целом. Поэтому с целью подбора лекарств, оказывающих селективное воздействие на соответствующие микроорганизмы или пораженные органы, проводится широкий скрининг биологически активных веществ (A.V. Kabanov [et al.], 2002; E.V. Batrakova [et al.], 1998; E.V. Batrakova [et al.], 1999; E.V. Batrakova [et al.], 2001; E.V. Batrakova [et al.], 2003; M. Ranson [et al.], 2002).

Однако даже для веществ, прошедших скрининг, специфичность, как правило, не основывается на способности селективно накапливаться в органе-мишени. Обычно они более или менее равномерно распределяются в организме, проявляя активность лишь в органе-мишени. Кроме того, чтобы достичь этого органа, лекарство должно пройти через многие другие органы, клетки, внутриклеточные пространства, мембраны и т.п. где оно может частично инактивироваться (C. Venstoen [et al.], 2015; B. Bielez, K. Klaushofer, 2004). Следовательно, чтобы достичь достаточной (терапевтической) концентрации лекарства в органе-мишени, приходится вводить его с запасом, и большая часть его будет теряться за счет метаболизма в здоровых тканях. Также, при многократном введении цитотоксических противоопухолевых средств или высокоантигенных белковых препаратов проявляется их вредное действие на организм. Чтобы избежать этих затруднений применяются новые методы введения лекарств, но они не всегда удобны для врача (S. Boros, R. Bindels, J. Hoenderop, 2009; B.F. Boyce, L. Xing, 2008).

Активное вещество и вспомогательный компонент, состоящий из природных или синтетических липидов, образуют мембранные пузырьки (везикулы) и мицеллы с большим внутренним объемом, которые предохраняют ЛС от нежелательного воздействия организма, снижают токсичность, увеличивают срок действия, снижают вводимую дозу и затраты на производство. Особенно перспективным считается использование фосфолипидов, образующих

наряду с бислойными мембранами также инвертированные мицеллярные структуры (P. Brenneisen, H. Steinbrenner, H. Sies, 2005).

Shim W.S. с соавторами (2005, 2006) разработали новую pH-чувствительную композицию на основе моно-метокси-поли (этилен гликоля), поли (D, L-лактид) и сульфаметазинового олигомера. Данная система имеет сравнительно низкую критическую концентрацию мицеллообразования при pH 7.0, которая может изменяться при повышении pH. Гидрофобная лекарственная субстанция паклитаксель (paclitaxel) была соединена с кополимером посредством pH-направленного метода мицеллообразования, с использованием органических соразтворителей. Полученный препарат показал хорошую стабильность. Авторы рекомендовали в дальнейшем использовать данную систему для конструирования инъекционных гелевых препаратов.

Kabanov A.V. и соавторы (2002 а,с) рассматривали в обзорах плуроник как формообразующий полимер, увеличивающий эффективность жидких лекарственных систем. Соединение лекарств с мицеллами, сформированными плуронином, увеличивает растворимость данных субстанций, стабилизирует их метаболизм и время циркуляции. Кроме того, данный формообразующий объект интересен и для генной терапии.

Кроме того, в ряде работ плуроники рассматриваются как переносчики ДНК, значительно увеличивающие ее экспрессию при внутримышечном введении. Так M.S. Khan и соавторы (2013) установили в своих исследованиях, что плаزمид SP1017, соединенная с двумя неионогенными переносчиками плуроник L61 и F127, обладает лучшей экспрессией при внутривенном введении, а сам препарат меньшей токсичностью.

На процесс распределения ЛС в организме влияют его состав, поверхностный заряд активного вещества, размер носителя, наличие специфических рецепторов на поверхности клеток и способ введения в организм.

Считается, что одним из важных свойств липосом и мицелл является их распределение в органах и тканях организма в зависимости от размера частицы. Если иммобилизация нежелательна, то размеры частиц должны быть ограничены

1 мкм. Частицы диаметром более 100 нм в значительной мере поглощаются макрофагами печени. ЛС с размером менее 100 нм могут проникать в гепатоциты печени. ЛС малых размеров аккумулируются более медленно, чем ЛС больших размеров. Удаление ЛС из организма происходит также со скоростями, зависящими от размера и состава ЛС (P. Brenneisen, H. Steinbrenner, H. Sies, 2005, I. Lee [et al.], 2005).

Использование активного вещества в комплексе с различными полимерами и ПАВ позволяет пролонгировать срок действия препарата и осуществлять целевой транспорт. Поэтому, особую актуальность приобрело создание форм лекарственных препаратов, в частности антибиотиков, удобных в применении, нетоксичных в терапевтических дозах и с эффективной концентрацией в организме, достаточной для полного излечения, с направленным действием на определенный орган или ткань и имеющей при этом доступную цену (В.И. Швец, 1987; M. Almgren, 2000; M. Ollivon [et al.], 2000).

Значительное влияние на действие лекарств оказывают вспомогательные вещества, которые, по сути, являются формообразующей матрицей действующих веществ (L. van Zuylen et al., 2001)

К вспомогательным веществам относятся различные природные и синтетические соединения, которые используются в процессе изготовления лекарственных форм, а именно: формообразующие (наполнители, растворители), поверхностно активные вещества – ПАВ (эмульгаторы, стабилизаторы в суспензиях, солубилизаторы), стабилизаторы (рН среды, антиоксиданты), пролонгаторы или вещества, замедляющие высвобождение или всасывание лекарственных веществ, кислотоустойчивые покрытия, корректирующие вещества, вещества для диффузии (G.S. Kwon, T. Okano, 1996; G. Lambert, 2003; A. Lavasanifar, J. Samuel, G.S. Kwon, 2002, X. Zhang [et al.], 1996).

Идеальным решением этой проблемы может стать разработка новых лекарственных форм, обладающих более высокой биодоступностью, пролонгированностью, обладающих возможностью направленного транспорта, т.е. способностью лекарства накапливаться в пораженном органе быстро,

селективно и количественно, независимо от места и способа его введения. Локальная концентрация лекарства в мишени должна быть достаточно большой, а его содержание в иных органах и тканях невелико, чтобы не вызывать побочных реакций (V.P. Torchilin, Trubetskoy, 1995; V.P. V.S. Torchilin, 1996).

Очевидны следующие преимущества данных улучшений: упрощение способа введения, значительное сокращение количества необходимого для лечения лекарства, возможность локального увеличения терапевтической концентрации лекарства, отсутствие системы побочных эффектов (Torchilin, 1996).

Липосомы используются как контейнеры для доставки лекарственных средств к органам мишеням. В современной фармацевтической промышленности пока только липосомальные препараты дошли до клинических испытаний в медицине и некоторые из них лицензированы (G. J.M. Zingg, 2007). По своей структуре липосомы представляют собой двухслойную мембрану, которая состоит из природных фосфолипидов, что определяет их многие привлекательные качества. Они нетоксичны, биodeградируемы, при определенных условиях могут поглощаться клетками, их мембрана может сливаться с клеточной мембраной, что приводит к внутриклеточной доставке их содержимого (В.М. Грецкий, Г.В. Цагарейшвили, 1979). Кроме того, вещество, заключенное в липосомы, защищено от воздействия ферментов, что увеличивает эффективность препаратов, подверженных биodeструкции в биологических жидкостях (R.B. Campbell [et al.], 2001; J.-F. Gagne [et al.], 2002).

Еще одно важное преимущество липосом как лекарственной формы – постепенное высвобождение лекарственного вещества, заключенного в них, что увеличивает время его действия. Соотношение размеров липосом (как, впрочем, и других наночастиц) и диаметра пор капилляров стало основой для конструирования эффективных антираковых препаратов (С. Furman[et al.], 2004, J.-F. Gagne [et al.], 2002).

Так как размер липосом больше диаметра пор капилляров, их объем распределения ограничивается местом введения. Например, при внутривенном

введении они не выходят за пределы кровотока, т.е. должны плохо проникать в органы и ткани (А.В. Караулов, О.В. Калюжин, 2013). Следовательно, резко понижается токсическое действие субстанции, ассоциированной наночастицами. С другой стороны, это свойство может служить основой для направленной доставки химиотерапевтических препаратов в опухоли и очаги воспаления, так как капилляры, снабжающие эти области кровью, как правило, сильно перфорированы, что позволяет липосомам проникать только в «горячие точки» (JG. Gaucher [et al.], 2005; D.L. Iden, T.M. Allen, 2001).

Но липосомы, как и другие наночастицы, довольно быстро захватываются ретикуло-эндотелиальной системой (РЭС). Это происходит вследствие взаимодействия липосом с белками плазмы – опсонинами (в основном, компонентами комплемента). Опсонины «метят» липосомы, делают их мишенями для РЭС. Понятно, что увеличение времени их циркуляции еще больше повышает эффективность липосомальных препаратов. С этой целью предложено модифицировать их поверхность полимерами с гибкой гидрофильной цепью, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ) (Т.М. Allen et al., 1991), фосфатидилэтаноламином, конъюгированным с ПЭГ. Очень эффективны липосомы для препаратов, мишенью которых являются клетки РЭС, так как именно эти клетки интенсивно поглощают наночастицы. Такая ситуация складывается при внутриклеточной микробной инфекции и при вакцинации. Доставка амфотерицина В непосредственно в зараженные клетки приводит к прекрасным результатам при системных грибковых инфекциях, висцеральном лейшманиозе. Во многих странах Европы уже можно купить подобные препараты (AmBiosome, ABLC, Amrkocil). Последний лицензирован и для российского рынка (А.П. Каплун и др., 1999). Однако липосомы имеют так же и ряд недостатков, к которым относится их дороговизна и нестойкость.

2.4.2 Применение наночастиц в качестве носителей лекарственных веществ

Одним из разрабатываемых в последние годы вариантов направленного транспорта лекарственных веществ в клетки и очаги бактериальных инфекций является использование коллоидных носителей, микроэмульсий и наночастиц для переноса активных веществ (P.F. Jacques [et al.], 2005; G. Gaucher [et al.], 2005). Наночастицы (НЧ) выделяются из ряда носителей, прежде всего, большей стабильностью (P.F. Jacques [et al.], 2005; G. Gaucher [et al.], 2005; M.S. Fleming [et al.], 2001; K.N.J. Burger et al., 2002).

Под термином «наночастица» (НЧ) обычно понимают коллоидные частицы размером от 10 до 1000 нм, состоящие из макромолекулярного материала, в который активно внедрено (растворено, связано, инкапсулировано или адсорбировано) лекарственное вещество. НЧ создают из искусственных или природных полимеров. Используют биосовместимые или биодegradуемые полимеры. Размеры НЧ лимитируются величиной диаметра самых мелких капилляров – 4 мкм (P.F. Jacques [et al.], 2005; G. Gaucher [et al.], 2005).

Наиболее распространенными видами НЧ являются поли(алкилцианоакрилатные), полистериновые, полиакроленовые, поли(винилпиридиновые), полиглутаральдегидные, белковые, желатиновые, полисахаридные (G. Lambert, 2003).

Как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* высвобождение лекарственных веществ из НЧ может проходить как десорбция с поверхности, диффузия из матрицы НЧ, эрозия матрицы, сочетание эрозии и диффузии (S.T. Lim [et al.], 2000; R.H. Müller, 2000).

Цианоакрилатные НЧ считаются быстро биодegradуемыми. Установлено, что после внутривенного введения НЧ, они подобно другим коллоидным носителям, связываются РЭС, в течение секунд или минут. НЧ элиминируются печенью, селезенкой, легкими, костным мозгом. Преимущественное распределение НЧ в РЭС выглядит следующим образом: в печени находится 60-90% от введенной дозы, в тканях селезенки 2-10%, в легких 3-20%, в костном мозге – менее 1%. В печени НЧ определяются, в основном, в клетках Купфера и небольшое количество – в гепатоцитах (J. Kreuter, 1985). Во внутриклеточной

среде наночастицы локализуются в различных структурах, например, в тканях или как депо железа в сидеробластах. При исследовании накопления поли-н-бутилцианоакрилатных наночастиц с ампицилином и гентамицином в лейкоцитах периферической крови человека установлено, что наибольшая концентрация НЧ с антибиотиком создается в моноцитах, меньшее количество препарата локализуется в полиморфноядерных лейкоцитах и еще ниже уровень в лимфоцитах (J. Kreuter, 1985).

При внутрибрюшинном назначении полиоксилцианоакрилатных или полиметилметакрилатных НЧ установлен лимфатический путь их транспорта из перитонеальной полости через грудной лимфатический проток в кровь. При этом концентрация НЧ в медиастинальных лимфатических узлах крыс в 2000 раз превышает концентрацию, создающуюся при внутривенном введении. При внутримышечном или подкожном введении меченых НЧ более 99% введенной дозы находили на месте введения, выведение было очень медленным и в течение 70 дней другой локализации НЧ не обнаруживали (S.T. Lim, 2000, N. Azam [et al.], 2003, G.F.M. Ball, 2006, B.W. Barry, 2002, B. Bielez, K. Klaushofer, 2004).

D. Vikle и соавторы (2003) изучали взаимодействие антигенов, заключенных в наночастицы, образованных на основе липидной матрицы, с иммунокомпетентными клетками (работа проводилась на культурах клеток). Авторы отмечают, что наночастица, взаимодействуя с дендритными клетками РЭС, деградирует, и заключенный в ней антиген презентруется на мембране. Также отмечалось, что данный комплекс вызывал непосредственное усиление Т клеточного ответа.

Микрочастицы на основе сополимера поли (лактид-гликолид), в последнее время имеют широкое распространение в качестве носителя для вакцин и лекарственных препаратов (H. Okada, H. Toguchi, 1995; S.D. Putney, P.A. Burke, 1998; J. Kreuter, P.P. Speiser, 1976, M. Christian [et al.], 2002). I. Scholl и соавторы (2004) проводили изучение влияния сополимера поли(лактид-гликолид) как носителя для лекарственного вещества при лечении аллергической реакции первого типа. Проводя ряд экспериментов на мышах линии BALB/c,

исследователи установили, что препарат, заключенный в наночастицу, регулирует выработку IgG1 и стимулирует выработку интерферонов и интерлейкина 10.

Сходные результаты были получены и М.Р. Desai с соавторами (2000), они изучали биодинамику стафилококкового энтеротоксина на модельных животных (крысах). В работе исследователи использовали биodeградируемый сополимер поли (лактид-гликолид), содержащий стафилококковый энтеротоксин, в качестве препарата сравнения использовали энтеротоксин, адсорбированный на гидроокиси алюминия. Авторы установили, что как антиген, адсорбированный на наноносителе, так и антиген, адсорбированный на гидроокиси алюминия, обладают сходными иммуностимулирующими свойствами, и в дальнейшем рекомендовали использовать данный препарат как вакцинный адъювант.

Также интересные работы проводились по использованию этого сополимера в качестве носителя для рДНК при конструировании ДНК вакцин (D. O'Hagan et al., 2001; M. Singh et al., 2001, 2002; Y. Luo et al., 2003; J. Haensler et al., 1999, Han Gang, Ghosh Partha, Vincent M. Rotello, 2007, I. Gutierrez [et al.], 2003, P.F. Jacques [et al.], 2005, S. Shyam, 2012, M.W. Yu [et al.], 1999). В других работах по этой теме многие исследователи отмечали важность размера носителя в передаче информации во внутреннюю среду клеток, в том числе и лимфоцитов (S.M. Moghimi et al., 1994).

Кроме того, исследования последних лет показали перспективность использования полимерных носителей в качестве систем эффективного, направленного транспорта высоко- и низкомолекулярных веществ (S.S. Agrawal, P. Munjal, 2007; B. Fubini [et al.], 1989). Полимеры в качестве веществ, способствующих доставке лекарственных средств (ЛС), должны взаимодействовать с лекарственным препаратом, не агрегировать при длительном хранении, быть дешевыми, простыми в приготовлении; с высокой избирательностью взаимодействия с клетками-мишенями; способными нести достаточное количество доставляемого вещества, иметь высокую эффективность и длительное время действия в органе-мишени (A. Lavasanifar [et al.], 2002; G.S. Kwon, K. Kataoka, 1995).

В качестве вспомогательных веществ (пролонгаторов, эмульгаторов и т.д.), а также как оптимальная система для конструирования препаратов, включающих в себя низкорастворимые активные вещества, в технологии производства ЛС нашли применение полимеры и ПАВ (S. Agatonovic-Kustrin [et al.], 2004). ПАВ представляют собой амфифильные соединения, которые при определенной концентрации в водном растворе вызывают образование мицелл, способных увеличивать растворимость соединений, доступность ЛС, уменьшать токсичность, способствовать переносу через биологические мембраны. Введение ЛС в мицеллу детергента существенно меняет их фармакокинетические свойства (M. Almgren, 2000). К тому же мицеллярное растворение рассматривается как альтернатива для растворения гидрофобных лекарств в водном окружении (С.О. Rangel-Yagui [et al.], 2005). Таким образом, мицеллу в общем случае можно определить как замкнутый монослой, а липосому (везикулу) как замкнутый бислой (Русанов, 1992; С.О. Rangel-Yagui [et al.]).

M.W. Duncan (2003) проводил конъюгирование лекарственных веществ с полимерными матрицами и изучал динамику данных комплексов на биологических моделях. Им было установлено повышение терапевтической эффективности данных комплексов, и способность адресно проникать к очагу воспаления.

Наряду с этим, в прошлое десятилетие, было разработано и интенсивно исследовано много нанометровых переносчиков, которые можно классифицировать в четыре главных группы: вирусные переносчики, органические катионоактивные составы, рекомбинантные белки и неорганические наночастицы. Было изучено много неорганических материалов, таких как фосфата кальция, золото, углеродистые материалы, кремниевое окиси, окиси железа и слоистые двойные гидроокиси (гидрата окиси) которые могли использоваться в наноиндустрии. Неорганические наночастицы показывают низкую токсичность и перспективны как средства управляемой доставки к органам мишеням, таким образом, представляя новую альтернативу вирусным и катионоактивным переносчикам. Они обладают универсальными свойствами, подходящими для

адресной доставки лекарственных веществ, включая широкое применение, богатые функциональные возможности, хорошую биологическую совместимость, потенциал поставки, для которой предназначаются (например, выборочно разрушающий раковые клетки, но экономящий нормальные ткани) и управляемое выделение лекарств (L.A. Dukman [et al.], 2006).

Коллоидные металлы имеют некоторое преимущество перед другими наночастицами, благодаря своему мелкому размеру, большой свободной поверхности, низкой токсичности, клеточной пенетрабельности и возможности поверхностной модификации. Поэтому золотые наночастицы представляют очень привлекательный и многообещающий материал для адресной доставке препарата к органам мишеням (M. Catherine [et al.], 2004; G. Han [et al.], 2007).

В настоящее время работы по созданию лекарственных средств на основе коллоидных металлов (в частности коллоидного золота) ведутся в основном в отношении противоопухолевых препаратов. Так как данная конструкция позволяет снизить токсичность противоракового препарата за счет адресной доставки.

Для повышения эффективности и уменьшения токсичности противоопухолевых препаратов следует обеспечить направленный транспорт лекарств в очаг развития патологического процесса. Существует пассивный и активный методы адресной доставки лекарств к опухолевым клеткам. Действие пассивного метода обусловлено проникновением конъюгатов золотых наночастиц с лекарственными веществами в нездоровые ткани через неплотные стенки кровеносных сосудов, пронизывающих опухоль. Метод активного мечения основан на функционализации конъюгатов наночастиц лигандами, специфичными к поверхностным рецепторам раковых клеток. Лиганды могут быть небольшими молекулами, пептидами и белками (P. Ghosh [et al.], 2008).

Группа ученых под руководством G.F. Paciotti (2004) проводили исследования *in vivo* для определения терапевтического эффекта Au-PEG-TNF – пегелированных золотых коллоидов, функционализированных белком TNF – (туморнекротическим фактором или фактором некроза опухоли) на привитую

опухоль MC-38 (G.F. Paciotti et al. 2004). При введении конъюгатов мышам внутривенно, наблюдалось их значительное скопление в опухолевой ткани по сравнению с печенью, селезенкой и другими здоровыми органами. Конъюгаты эффективнее способствовали уменьшению опухоли, чем чистый белок. В следующих работах этой группы предлагается усовершенствованная терапия с введением противоопухолевого препарата паклитаксела в комплекс Au-PEG-TNF (G.F. Paciotti [et al], 2006).

В работе группы M. Ollivon (M. Ollivon [et al.], 2009) был разработан метод прикрепления и доставки комплекса Pt (IV) (прототип препарата из семейства платиновых противоопухолевых лекарств, сродных цисплатину, карбоплатину и их аналогам) с использованием конъюгатов золотых наносфер с поливалентными олигонуклеотидами (ДНК-Au НЧ). В качестве биологических объектов использовались клеточные линии A549 (рак легких человека), PC3 (рак предстательной железы человека), HeLa и U2OS (остеосаркома). Неактивный комплекс Pt(IV) становится активным в отношении нескольких несущих онковирус клеточных линиях при присоединении к ДНК-Au НЧ. Конъюгаты поглощаются клетками, в клетках происходит высвобождение цисплатина, который проникает в ядра и связывается с ДНК. Комплекс Pt-ДНК-Au НЧ является более эффективными, чем цисплатин для уничтожения нескольких видов клеточных линий, несущих онковирус.

К сожалению, по биологическим свойствам коллоидного селена в литературе встречаются только единичные сообщения. В этом отношении хочется отметить работу Bo Huang [et al] (2003) где авторы синтезировали комплекс коллоидного селена с белками и установили его биологическую активность *in vitro*.

Однако по фармакологии коллоидных частиц, в том числе и коллоидного золота в литературе встречаются только единичные работы.

Так В. Devika Chithrani, Arezou A. Ghazani (2006) показали зависимость кинетики и концентрации предельного накопления КЗ клетками (опухолевыми) от

размера наночастиц (период полувыведения наночастиц размером 14, 50 и 74 нм составил 2.10, 1.90 и 2.24 ч. соответственно).

Поэтому хочется отметить что, сочетание коллоидных частиц с биоактивными низкомолекулярными веществами может привести к появлению новых дополнительных, не связанных с основным действием свойств данного активного вещества в составе лекарственной формы.

Многие группы исследователей уделяют большое внимание синтезу и изучению свойств различных наноматериалов. Наночастицы имеют множество положительных свойств: их можно легко транспортировать, присоединять к их поверхности диагностические и терапевтические вещества, а также иммуноактивные биомолекулы. Эти уникальные свойства наночастиц делают их пригодными для терапевтического применения при лечении различных заболеваний. Наночастицы обладают пониженной токсичностью и малым временем для высвобождения лекарственного средства в системе кровообращения из-за их специфической и целевой характеристики.

Наноматериалы основанные на золоте, в основном представлены золотыми наночастицами (AuNPs), золотыми наностержнями (AuNRs), нанооболочками (AuNSs), и наноклетками (AuNCs). Однако исследователи рассматривают данные частицы в основном как носители молекул, обладающих большой молекулярной массой (белковые и полисахаридные антигены), это можно связать с иммуностимулирующими свойствами самих золотых частиц. Так же встречаются интересные работы по применению золотых наночастиц в онкологии и диагностики (R. B. Shahripour, M. R. Harrigan ,A. V. Alexandrov, 2014, S. Shah, 2008, S. Rajesh [et al.], 2009, I.B. Pathan, C.M. Setty, 2009).

2.5 Биологически активные вещества в терапии патологических состояний печени у животных

Широко известно, что при патологии печени происходит не только функциональные нарушения, связанные с самим органом, но и значительные изменения практически всех органов и систем организма. Поэтому терапия

должна быть направлена не только на восстановление самого органа и функций с ним связанных, но и поддержание функциональной активности всех систем организма. Это прежде всего поддержание естественной резистентности организма.

На протяжении долгого времени одним из основных иммуномодулирующих средств остается диоксометилтетрагидропиримидин (метилурацил). Вместе с сульфадиметоксином, тримекаином и хлорамфениколом метилурацил входит в список жизненно необходимых лекарственных средств. По химическому строению метилурацил относят к соединениям пиримидинового ряда. Препараты на основе метилурацила стимулируют метаболизм, клеточный и гуморальный иммунитет, эритро – и лейкопоз, ускоряет процессы регенерации ткани, нормализует процессы нуклеинового обмена в организме. Кроме того, метилурацил оказывает противовоспалительное действие, поскольку обладает способностью ингибировать протеолитические ферменты. Данный препарат эффективен при алиментарно – токсической алейкии, агранулоцитарной анемии, хроническом бензолном отравлении, лейкопении, злокачественных новообразованиях, при радиотерапии и других состояниях, сопровождающихся лейкопенией, тромбоцитопенией. Назначают метилурацил также при лечении ожогов и переломах костей. Имеются также данные об эффективности метилурацила при лечении язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, хроническом гастрите, гепатите. Также исследуется возможность применения метилурацила и его производных в качестве антиоксиданта. Таким образом, несмотря на столь широкий спектр активности и низкую стоимость субстанции метилурацила, его основным недостатком является слабая растворимость в воде и органических растворителях (до 0,9%), что и обуславливает отсутствие инъекционных препаратов на его основе. Наличие инъекционной формы препарата значительно увеличивает его биодоступность и эффективность.

Метилурацил впервые был синтезирован во второй двадцатого века R. Behrend, посредством взаимодействия мочевины и ацетоуксусного эфира через b-

уреидкротоновый эфир. Данное соединение было предложено в качестве лекарственного средства для улучшения обменных процессов, ускорение регенерации тканей, проявляющего противовоспалительную активность, активирующего клеточный и гуморальный иммунитет, систему образования клеток крови. Помимо вышеупомянутого соединения используются также другой вариант, который носит название пентоксил (Н.В. Лазарев, 1963).

Это соединение по химической структуре представляет собой 5-гидроксиметил-6-метил-2,4 (1Н,-3Н)-пиримидиндион. Это вещество используется для стимуляции процессов образования лейкоцитов, при заболеваниях органов дыхания, которые носят инфекционно-воспалительный характер, с прогрессирующим угнетением фагоцитоза. Обладает раздражающим действием на кожу, в связи с этим местно данное вещество не применяют. Переходит в метилурацил и формальдегид, при чем данный процесс зависит от температуры и ускоряется при нагревании (Ю.П. Таран, А.Н. Шишкина, 1993). Предполагают, что раздражающее действие данное соединение оказывает в связи с образованием метанала.

Первым применять пуриновые и пиримидиновые производные для стимуляции метаболизма и жизненно важных процессов предложили Н.Б. Ларькина, Е.Б. Романенко, А.В. Лебедев. Они же произвели ряд экспериментов, в результате которых синтезировали соединения для применения в лечебных целях. В 1955 г. коллективом авторов были получены авторские права на синтез метилурацила из дикетона и мочевины (А.В. Лебедев, 1995).

Столь обширное действие метилурацила на основные функции организма объясняется его влиянием на синтез белков. При введении в рацион данного соединения в дозировке 200 мг/кг корма в течение 14 дней эксперимента лабораторные животные увеличивали привесы и скорость роста на 12,9 % и 9,0 % у самцов и самок соответственно. Также было установлено, что при добавлении метилурацила в рацион мелкого рогатого скота приводило к увеличению концентрации общего белка в сыворотке крови, количества сухого вещества и белка в мышечной ткани и приводило к интенсивному росту животных, но

данные изменения не превышали физиологические нормы, характерные для исследуемого вида животных, а лишь приближались к его верхним границам (S. Pollastri [et al.], 2011).

На данный момент установлены следующее положительное влияние метилурацила на организм животных и человека: анаболическое действие; стимуляция регенераторных процессов в органах и тканях, которое проявляется на разных уровнях организации живого - молекулярном, субклеточном, клеточном, тканевом и органном, усиление лейко- и эритропоеза, стимуляция иммунитета, противовоспалительное действие, улучшение фагоцитоза, снижение болевых ощущений, адаптогенное действие, способность вступать в синергизм с антибиотиками и усиливать их действие.

Использование метилурацила оправдало себя в офтальмологии, акушерстве и гинекологии, дерматологии. Например, комбинированное использование метилурацила и антибиотиков дает хороший результат при терапии кожного лейшманиоза. В короткие сроки прекращались воспалительные процессы, более происходило рубцевание кожи без заметных проявлений. Отмечалось наличие фотозащитного эффекта, что делает перспективным применение данного вещества для профилактики фотодерматозов. Для хирургического использования метилурацил применяется для лечения ожогов различной степени и генеза, а также ран.

Эффективность метилурацила установлена и в гастроэнтерологии при терапии разных форм язв практически всех отделов ЖКТ. По некоторым данным противоязвенная активность метилурацила превосходит викалин.

Для стимуляции лейкопоеза, эритропоеза и синтеза гемоглобина в гематологии на протяжении длительного времени применяли препараты метилурацила (В.И. Ноздрин, Т.А. Белоусова, А.Н. Яцковский, 2002). Например, метилурацил вводили в схему комплексной терапии постгеморрагических анемий, что способствовало переходу гипорегенераторного типа костномозгового кроветворения в регенераторно-физиологический тип с умеренной гиперрегенерацией (С.А. Жучков, 2002).

Не смотря на длительную историю применения с момента создания, механизм действия метилурацила еще недостаточно изучен. Один из основоположников применения данного соединения Н.В. Лазарев отмечал, что метилурацил может выступать в качестве аналогов метаболитов, других промежуточных продуктов обмена веществ, а также в качестве веществ «компенсирующих» метаболиты в необходимых органах. Установлено, что соединение действует исключительно в клетке и неактивно во внеклеточной среде. Отмечено, что, хотя метилурацил и является аналогом тимина, не включается в синтез нуклеиновых кислот (К.С. Гузев, В.И. Ноздрин, В.П. Бобылев, 2000).

Таким образом, несмотря на столь широкий спектр активности и низкую стоимость субстанции метилурацила, его основным недостатком является слабая растворимость в воде и органических растворителях (до 0,9%), что и обуславливает отсутствие инъекционных препаратов на его основе. Наличие инъекционной формы препарата значительно увеличивает его биодоступность и эффективность.

Кроме того, у животных с различными заболеваниями печени широко распространены микроэлементозы и гиповитаминозы метаболизм которых тесно связан с функциональной активностью самого органа, что усугубляет течение основного заболевания. Комплексная терапия патологий печени включает в себя и коррекцию недостатка витаминов и микро - и макроэлементов, что способствует нормализации обмена веществ, улучшению регенерации ткани в печени и повышение общей резистентности организма.

Витамин А относится к группе ретиноидов. Данная группа обширная и включает в себя ретинол (витамин А₁, аксерофтол), дегидроретинол (витамин А₂), ретиналь (ретилен, альдегид витамина А₁), ретиноевую кислоту. Метаболическими предшественниками, а соответственно и провитаминами, являются каротиноиды. Особенно в этом отношении интересен β-каротин (М.А. Самотруева [и др.], 2015.). В отличие от других каротиноидов, таких как а-каротин, g-каротин и криптоксантин, которые в организме предоставляют

возможность для синтеза только одной молекулы витамина А, β -каротин в процессе метаболических превращений расщепляется до двух молекул-предшественников витамина А (Wagner, 2011). Другие каротиноиды не могут превращаться в витамин А из-за различий в их химической структуре. Превращение β -каротина в витамин А в организме происходит под действием фермента β -каротин-15,15'-диоксигеназы. Если наблюдается снижение концентрации витамина в организме, то усиливается продукция диоксигеназы, позволяющая увеличивать превращение витамина А из каротиноидов (M. Christian [et al.], 2002, J.A. Wagner, 2011). Активность фермента снижается после восстановления уровня витамина. В основном превращение витамина происходит в слизистой оболочке тонкой кишки и в печени. Однако больше всего образуется витамина А в кишечнике при всасывании. Печень способна метаболизировать циркулирующий в крови β -каротин. Если в организме наблюдается достаточное количество витамина А, то происходит накопление β -каротина в организме (G. Gaucher [et al.], 2005). Основным местом, где аккумулируется данное соединение, является жировая ткань. Также часть β -каротина циркулирует в крови. Избыток вышеназванного соединения определяется по изменению цвета непигментированной кожи, слизистых: они становятся желтоватыми (Е.Н. Harrison, 2012).

В организме витамин А выполняет ряд важнейших функций: он необходим для нормального функционирования органов зрения, поскольку ретиналь является структурной частью родопсина-зрительного пигмента, стимулирует рост клеток и целостность эпителия, главным образом в форме ретиноевой кислоты, участвует в синтезе клеток крови. Также имеются данные, что ретинол является составным компонентом клеточной мембраны. Отмечается положительное влияние витамина на иммунитет и репродуктивную систему.

Все вещества, составляющие понятие «витамина А» имеют кристаллическую структуру, не растворимы в воде и хорошо растворимы в органических растворителях. Очень чувствителен к свету ретинол и легко разлагается на воздухе под воздействием кислорода (Е.Н. Harrison, 2001).

Вещества из группы ретиноидов представляют собой соединения, структурно состоящие из ароматического кольца, часть превичной спиртовой группы, двух боковых цепей, являющихся остатками изопрена (С. Furman[et al.], 2007). Ретинол претерпевает в организме окисление спиртовой группы до алдегида (ретиаль) или карбоксильной группы (ретиноевая кислота). Депонируются ретиноиды в печени в виде ретинилпальмитата, ретинилацетата и ретинилфосфата. В природе ввиду нестабильности ретинола он находится в виде сложных эфиров (J.-F. Gagne [et al.], 2002).

Растения содержат провитамины А – вещества из группы каротиноидов. Кроме того, отмечается, что предшественниками соединения могут быть как каротины, так и ксантофиллы. Поскольку каротиноиды содержат цепи изопрена, то α и γ -каротины содержат по одному β -иононовому кольцу, что при окислении обуславливает получение одной молекулы ретинола. β -каротин содержит два кольца, поэтому он более активен с биологической точки зрения, в результате его окисления получаются две молекулы ретинола. Как говорилось выше, превращение осуществляет фермент 15-15'-монооксигеназа. Так, например, у представителей кошачьих данный фермент не синтезируется, а, следовательно, они не могут перерабатывать каротиноиды в вещества, составляющие витамин А (R. Gaza'k, D. Walterova, V. Kren, 2007). Таким образом, ни один из представителей каротиноидов не является предшественников ретиноидов.

Метаболизм витамина А невозможен без участия ряда ферментов класса гидролаз: карбоксилэстеразы и липазы, которые вырабатываются в поджелудочной железе и слизистой тонкого кишечника (R. Gaza'k, D. Walterova, V. Kren, 2007). Однако, если в питании животного недостаточное количество жиров или нарушается выработка желчи, то всасывание ретиноидов невозможно, что объясняется не растворимостью в воде. Энтероциты всасывают витамин в виде мицеллярных образований, которые затем в клетках кишечника входят в состав хиломикронов (S. Wada, 2009, J.A. McAnally, 2007). В лимфу витамин поступает уже в форме эфира пальмитиновой кислоты. При этом всасываться может только ацетат ретинола. Первым этапом метаболизма β -каротина является

расщепление посредством 15-15'-монооксигеназы, что ведет к образованию ретиналя, затем при помощи коферментов НАД и НАДФ происходит расщепление редуктазой. Одновременный прием с пищей, содержащей каротин, витамина В₁₂ увеличивает продукцию витамина А почти в 2 раза за счет активации монооксигеназ, что увеличивает количество молекул каротина, расщепляющихся по центральному типу (J.A. McAnally, 2007).

В печени синтезируется и присутствует специальный транспортный белок, который соединяется с ретинолом. Имеются данные, что ретиноевая кислота связывается с альбуминами. В связанном виде обеспечивается растворимость витамина, защита от окисления, осуществляется транспорт к тканям и органам. Несвязанная форма токсична для организма. Для недопущения фильтрации и выведения витамина А почками, происходит еще одно связывание с другим транспортным белком – транстиретином. Затем, в процессе использования клетками, витамин отщепляется от транспортных белков. Помимо печени, где происходит накопление до 90% витамина, ретиноиды депонируются в почках, жировой ткани, надпочечниках.

Клетки органов-мишеней имеют специальные рецепторы, расположенные в цитозоле, которые способны распознавать связанный комплекс белков-транспортировщиков и ретиноида. В сетчатке глаза происходит очередное окисление и превращение ретинола в ретиналь. В печени витамин подвергается изменениям, в результате которых образуются активные метаболиты- ретиналь и ретиноевую кислоту, выводящуюся в составе желчи)- затем в неактивные, для вывода последних из организма.

Не смотря на целый спектр выполняемых функций, наибольший интерес представляет значение витамина для системы зрения. 11-Цис-ретиналь образует пигменты ярко-красного цвета родопсин или один из трёх видов йодопсинов после связывания с белками опсинами (S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, 2001) Восприятие изображения при участии родопсина происходит по следующим механизмам. После раздражения родопсина квантом света происходит изомеризация связи в ретинале из цис- типа в транс тип, которая

носит название батородопсин или активированный родопсин (V.N. Pavlik [et al.]). При освещении происходит обесцвечивание родопсина, поскольку транс-ретинол имеет бледный желтый оттенок. Когда происходит освобождение протона из молекулы активированного родопсина, образуется метаформа родопсина (H.D. Sessa, 2008). Под действием гидролизующих процессов молекула дает опсин и транс-ретинол. Механизм восприятия света и происходящие в связи с этим химические превращения в молекуле батородопсина активирует G-белок, вторичного посредника, активирующего синтез ГТФ. Связанные G-белки и ГДФ способствуют активацию фосфодиэстеразы, отвечающей за расщепление циклического ГМФ, что ведет к снижению концентрации последней внутри клетки. Падение концентрации цГМФ способствует закрытию натриевых и кальциевых каналов, приводящей к деполяризации мембраны и образованию нервного импульса, которое в головном мозге превращается в зрительный образ (J.M. Zingg, 2007).

Образование цис-формы ретинола катализируется ферментом ретинолизомеразой – длительный процесс, который протекает в присутствии света. Главным образом процессы изомеризации из цис-в транс-форму происходит в печени и лишь небольшой частью в сетчатке (S. Wada, 2009). Также в сетчатке происходит ряд реакции, в результате происходит образование транс-ретинола, связывающий с транспортным белком и, поступая, в кровь, поступает в печень (L.W. Weber [et al.], 2003). В печени имеется изомераза, отвечающая за превращение транс-ретинола в цис-форму, а затем, под действием дигидрогеназы, вновь происходит превращение в цис-ретинол, транспортируемый обратно в сетчатку. Образование родопсина из цис-формы ретинола и белка опсина происходит в отсутствие света. Аналогичный процесс происходит в так называемых колбочках, которых в сетчатке три вида. Эти пигменты тоже содержат 11-цис-ретинол, но белок опсин по структуре отличается.

Также весьма важным является антиоксидантная роль витамина А. Поскольку в молекуле ретинола содержится две сопряженные двойные связи, ретинол способен вступать во взаимодействие со свободными радикалами, также

с агрессивными формами кислорода. Отмечено, что витамин А является своего рода синергистом витамина Е и способен усиливать его эффективность (S.R. Wells [et al.], 2010). В совокупности с витамином Е и витамином С ретинол активизирует процессы включения селена в состав глутатионпероксидазы. Витамин А способствует поддержанию SH-групп, у которых также отмечается антиоксидантная активность, в восстановленном состоянии. В свою очередь витамин Е препятствует окислению витамина А, который легко поддается окислению кислородом (C.J. World [et al.], 2006).

Недостаток витамина А может являться первичным или вторичным. Первичный дефицит объясняется недополучением животными витаминов и провитаминов с кормами. Вторичный дефицит регистрируется при хронических патологиях, касающихся нарушения всасывания липидов, желчеобразования, воздействием токсинов, нарушающих работу печени (Haifeng Zhang [et al.], 2007). Также возможно адекватное количество витамина А и каротиноидов в рационе, но недостаточное поступление жиров в организм, поскольку всасывание данного витамина напрямую зависит от включения ретиноидов в состав мицелл (Т. Lindh [et al.], 1996). Транспортные белки, связывающиеся с продуктами превращения ретинола, не могут синтезироваться в отсутствие цинка. Также цинк принимает роль кофактора в процессах превращения ретинола в ретиналь.

Дефицит витамина А проявляется следующими нарушениями: ксерофтальмия, кератомалация, образование «бельма» на глазу, снижение темновой адаптации, повреждение кожи (гиперкератоз), поражаются слизистые оболочки кишечника, бронхов, мочеполовой системы. На фоне данных нарушений могут возникать язвы в кишечнике, бронхиты. Отмечаются отставание в росте, снижается общая резистентность (S.M. Lippman [et al.], 2005, E. Lonn [et al.], 2005).

Витамин D. Представлен группой веществ. Частично синтезируется в коже под действием ультрафиолетовых лучей (холекальциферол или витамин D₃). Другое соединение (эргокальциферол или витамин D₂) организм получает только с пищей (Y. Luo [et al.], 2003).

Витамин D организм может получить из двух источников: изомеризация 7-дегидрохолестерина (7-DHC) в коже в витамин D₃ под воздействием ультрафиолетовых лучей или при приеме вместе с продуктами питания витамина D₂ или D₃. Только несколько продуктов, в том числе масло печени трески и некоторые виды рыбы, например, лосось и сардины, в естественном состоянии содержат много витамина D₃ (P.H. Anderson, G.J. Atkins, 2008). Витамин D₂ образуется в некоторых растениях за счет преобразования эргостерина в витамин D₂ под действием ультрафиолетового света (X-Y. Bai [et al.], 2003, V. Geisen, K. Weber, K. Hartmann, 2009, D.R. Godfrey [et al.], 2005).

Ультрафиолетовый свет в диапазоне от 270 до 315 нм необходим для превращения 7-DHC в коже в провитамин D₃, который затем подвергается изомеризации при определенной температуре в витамин D₃ в течение 3х дней. Эффективность образования витамина D₃ в коже влияют пигментация кожи и интенсивность ультрафиолетового света. Меланин конкурирует с 7-DHC за ультрафиолетовые фотоны, и более длительное время пребывания на солнечном свету требуется для максимального образования провитамина D₃ у животных с темной кожей (T.J. Berndt, S. Schiavi, R. Kumar, 2005, D. Goltzman [et al.], 2004, S. Hannam, S. Lee, M. Sellars, 2004, S. Hatun [et al.], 2005). Интенсивность ультрафиолетового света, который достигает кожи животного, зависит от широты и высоты. Ультрафиолетовое излучение меньше на более высоких широтах, особенно в зимний период, когда дневные часы короткие. Когда высота солнца меньше 35 °, как это происходит зимой на широтах 31 ° или выше, недостаточно проникновения ультрафиолетового света для преобразования 7-DHC в провитамин D₃. На большой высоте ультрафиолетовое излучение может быть интенсивным, и животные могут подвергаться чрезмерному или слишком длительному воздействию солнца. В этих ситуациях провитамин D₃ фотоизомеризуется в биологически инертный тахистерол и ламистерол, которые отторгаются кератиноцитами при нормальном облучении кожи.

Различные виды животных различаются по своей способности образовывать витамин D₃ в коже. Например, воздействие ультрафиолетового излучения на

собак и кошек существенно не увеличивает концентрацию дермального витамина D₃. В то же время, подобное облучение крыс приводит к 40-кратному увеличению содержания витамина D₃. Это, по-видимому, связано с наличием 7-DHC -Δ⁷-редуктазы, фермента, способного разлагать 7-DHC, в коже кошек. Неудивительно, что исследование в Австралии показало, что в отличие от других видов в сыворотке крови собак не обнаружено сезонных изменений в содержании 25-гидроксивитаминах (S. Boros, R. Bindels, J. Hoenderop, 2009).

В своем естественном состоянии собаки и кошки удовлетворяли бы свои требования к витаминам от потребления жира, печени и крови их добычи, но домашние собаки и кошки нуждаются в пищевых добавках. Большинство травоядных животных способно продуцировать витамин D₃ в ответ на ультрафиолетовое облучение кожи, о чем свидетельствуют более высокие концентрации витамина D₃ в сыворотке крови у остриженных овец, чем у нестриженных овец. Ламы и альпаки оказались очень восприимчивыми к дефициту витамина D. Эти представители семейства верблюдовых развились с плотным шерстяным покровом и пигментацией, чтобы защитить их от интенсивного солнечного излучения, присутствующего в их естественной среде на вершинах Анд (S. Boros, R. Bindels, J. Hoenderop, 2009). При перемещении на более низкие высоты или более высокие широты, где солнечная радиация значительно ниже, витамин D в сыворотке крови лам и альпак снижался до низкого уровня, особенно в зимний период.

Когда витамин D₃ образуется в коже, он связывается с витамин-D-связывающим белком в капиллярах дермы, и далее либо хранится в жировой клетчатке, либо транспортируется в печень. Независимо от того, получается ли он от воздействия солнца или присутствуют в достаточном количестве в корме, витамины D₂ и D₃ являются биологически неактивными и должны пройти две реакции гидроксирования, которые должны быть активированы. Витамин D превращается в его активную форму - 1,25-дигидроксивитамин D₃. 25-гидроксирование происходит главным образом в печени, тогда как второе 1α-гидроксирование происходит в почках. Витамин D становится биологически

активным только после завершения второго гидроксилирования (S. Boros, R. Bindels, J. Hoenderop, 2009).

Воздействие 7-дегидрохолестерина на кожу в ответ на ультрафиолетовое облучение приводит к термической изомеризации в витамин D₃, который переносится витамином D-связывающим белком в печень. Цитохромом P₄₅₀ в печени, который осуществляет перенос витамина в почки и 1α-гидроксилирование в проксимальных извитых канальцах с образованием 1,25-дигидроксивитамина D₃, активной формы витамина D. Также включены пути пробоя, катализируемые цитохромами CYP24. Изомеризация 7-дегидрохолестерина также ведет к образованию тахистерола и ламистерола, которые являются биологически инертными и оотторгаются в кератиноцитах при нормальном облучении кожи (B. Bielecz, K. Klaushofer, 2004).

25-гидроксилирование в печени. Ряд печеночных цитохромов P⁴⁵⁰_s предположительно выполняют роль проведения 25-гидроксилирования витамина D, включая CYP27A1, CYP3A4, CYP2R1 и CYP2J3, и эта стадия метаболизма витамина D в значительной степени не регулируется. Из-за его сильной связи с витамином D-связывающим белком 25 (ОН) D₃ является стабильным и является основной формой витамина D в обращении. Концентрация 25 (ОН) D в сыворотке пропорциональна температуре (BF. Youse, L. Xing, 2008).

1α-гидроксилирование в почках. Следующий шаг в процессе активации витамина D зависит от концентрации ионизированного кальция в плазме. Если концентрация ионизированного кальция в крови низкая, почечная 1α-гидроксилирование 25 (ОН) D происходит с образованием активной формы витамина D (1,25 (ОН) 2D₃), но, если концентрация кальция адекватна, 25 (ОН) D подвергается 24-гидроксилированию в неактивный метаболит. Почечная 1α-гидроксилаза (CYP_{27B1}) также регулируется паратгормоном (ПТГ), кальцитонином и ингибированием обратной связи на 1,25 (ОН) 2D₃. Когда плазменный ионизированный кальций является низким, ПТГ может непосредственно стимулировать промотор гена 1α-гидроксилазы или опосредованно стимулировать образование и активность мРНК почек 1α-

гидроксилазы через пути цАМФ (K.Brock [et al.], 2004). Однако, когда концентрации ионизированного кальция в плазме нормальны, считается, что кальцитонин повышает регуляцию почечной 1α -гидроксилазы $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Функции витамина D. Основными органами, на которые воздействует витамин D, являются кишечник, кости, почки и паращитовидные железы. Вместе с ПТГ основной функцией витамина D является поддержание концентрации ионизированного кальция и фосфата в плазме в узких физиологических пределах (С.М. Vula [et al.], 2005).

В кишечнике $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ способствует активному поглощению и трансцеллюлярному переносу кальция. Эпителиальный кальциевый канал переносит кальций в клетку, где он связывается с кальбиндином D и переносится в клетку. Ca^{2+} -АТФаза и $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ -ионнообменник, затем выделяет кальций в кровотоки. Также происходит парацеллюлярный перенос кальция с помощью электрохимического градиента. Кальциевый канал и кальбиндин регулируются $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, тем самым увеличивая абсорбцию кальция в кишечнике, тогда как высокая концентрация кальция обеспечивают обратную связь к определенным эпителиальным белкам-каналам TRPV6, тем самым уменьшая абсорбцию кальция в кишечнике. TRPV6 и кальбиндин также могут индуцироваться, независимо от витамина D и концентрации кальция в крови, благодаря повышенному содержанию кальция в пище и кишечнике (R.B. Campbell, S.V. Balasubramanian, R.M. Straubinger, 2001).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ увеличивает поглощение фосфата в кишечнике, что приводит к увеличению экспрессии переносчика Na-P и измененной липидной композиции клеточной мембраны.

Дефицит витамина D приводит к развитию рахита в раннем возрасте и остеомаляции у взрослых животных. Длительный недостаток витамина может стать причиной развития онкологических заболеваний, увеличивается вероятность развития остеопороза. Кроме того, приводятся данные о негативном воздействии недостатка витамина на иммунитет, увеличение риска развития

сердечно-сосудистых заболеваний, развитие аутоиммунных заболеваний (С. Carrion, J.C. Domingo, M.A. de Madariaga, 2001).

Витамин Е. Наиболее сильным природным антиоксидантом считается витамин Е. Однако в процессах ингибирования перекисного окисления липидов могут участвовать только восстановленные формы витамина Е. Восстановителем формы витамина Е является аскорбиновая кислота.

Хотя антиоксидантное действие витамина Е является важным механизмом в изменении иммунной реакции, высказано предположение о воздействии его на систему иммунитета посредством вмешательства в биосинтез простагландинов (R.J. Glynn [et al.], 2007, R.G. Geissler [et al.], 1994, S.M. Graham [et al.], 2007, A.C. Howard [et al.], 2011, Q. Jiang [et al.], 2004, N. Kono [et al.], 2013, E. Lonn [et al.], 2005)

Альфа-токоферол, селенит натрия, ряд фенольных соединений природного происхождения оказывают выраженное гепатопротекторное действие при нарушении функции печени, вызванных гепатотропными ядами, способствуют снижению нарастающего количества перекисного окисления липидов в крови, жёлчи, гомогенатах тканей внутренних органов (M. Christian [et al.], 2002).

Таким образом, на основании вышеизложенного можно заключить, что коррекция патологий печени должна быть комплексной и включать нетоксичные и обладающие высокой биодоступностью лекарственные средства с направленным действием на печеночные клетки (С. Manach [et al.], 2004, F. Mangialasche [et al.], 2013, E. Niki, M.G. Traber, 2012, V.N. Pavlik [et al.], 2009)

Очевидно, что разработка новых лекарственных средств и поиск перспективных методов фармакологической коррекции поражений печени является весьма актуальной проблемой. Поэтому разработка и внедрение в ветеринарную практику эффективных и доступных по цене ветеринарных гепатопротекторных препаратов, а также разработка на их основе схем лечения составила предмет наших исследований (H.D. Sesso, 2008, W.L. Stone [et al.], 2004, J.M. Zingg, 2007, S. Takahashi [et al.], 2009).

III. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Методология, материал и методы исследования

Работа выполнялась в период с 2006 по 2017 годы на базе кафедры «Болезни животных и ветеринарно–санитарная экспертиза» факультета «Ветеринарной медицины, пищевых и биотехнологий» ФГБОУ ВО «Саратовский ГАУ им. Н.И. Вавилова».

Ряд исследований были выполнены на базе СарНИВИ-филиал ФГБНУ ФИЦВиМ и ФГБУН Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

Научно-производственные исследования проводились в условиях сельскохозяйственных предприятий: учебно – опытное хозяйство «Муммовское» ФГБОУ ВПО «Российский ГАУ - МСХА им. К.А. Тимирязева» Аткарского района, Саратовской области; ООО «Птицефабрика «Симбирская», с. Поповка, Чердаклинского района, Ульяновской области; КФХ «Давыдов» Петровского района Саратовской области; ЛПХ «Абдулаев», Петровского района, Саратовской области. А также ветеринарных клиник для животных «Doctor-Vet» г. Саратов.

Предмет исследований включал состояние гомеостаза организма животных, физико-химические, биодинамические и фармако-токсикологические свойства разработанных гепатопротекторных лекарственных препаратов. Их терапевтическая эффективность при патологических состояниях печени у сельскохозяйственных и мелких непродуктивных животных. Кровь лабораторных животных, коров, поросят и собак. Клинические, морфологические, биохимические исследования.

Объектом исследований явились коровы 2 - 3 периода лактации, плотоядные (собаки), поросята отъемного периода. Лабораторные животные (белые нелинейные мыши, мыши линии BALb/c, белые нелинейные крысы, кролики, морские свинки), гепатопротекторные препараты на основе полимерных матриц, наночастиц селена и золота конъюгированные с силимарином. Экспериментальная часть диссертационной работы делилась на семь

последовательных этапов, представленных на рисунке 1.

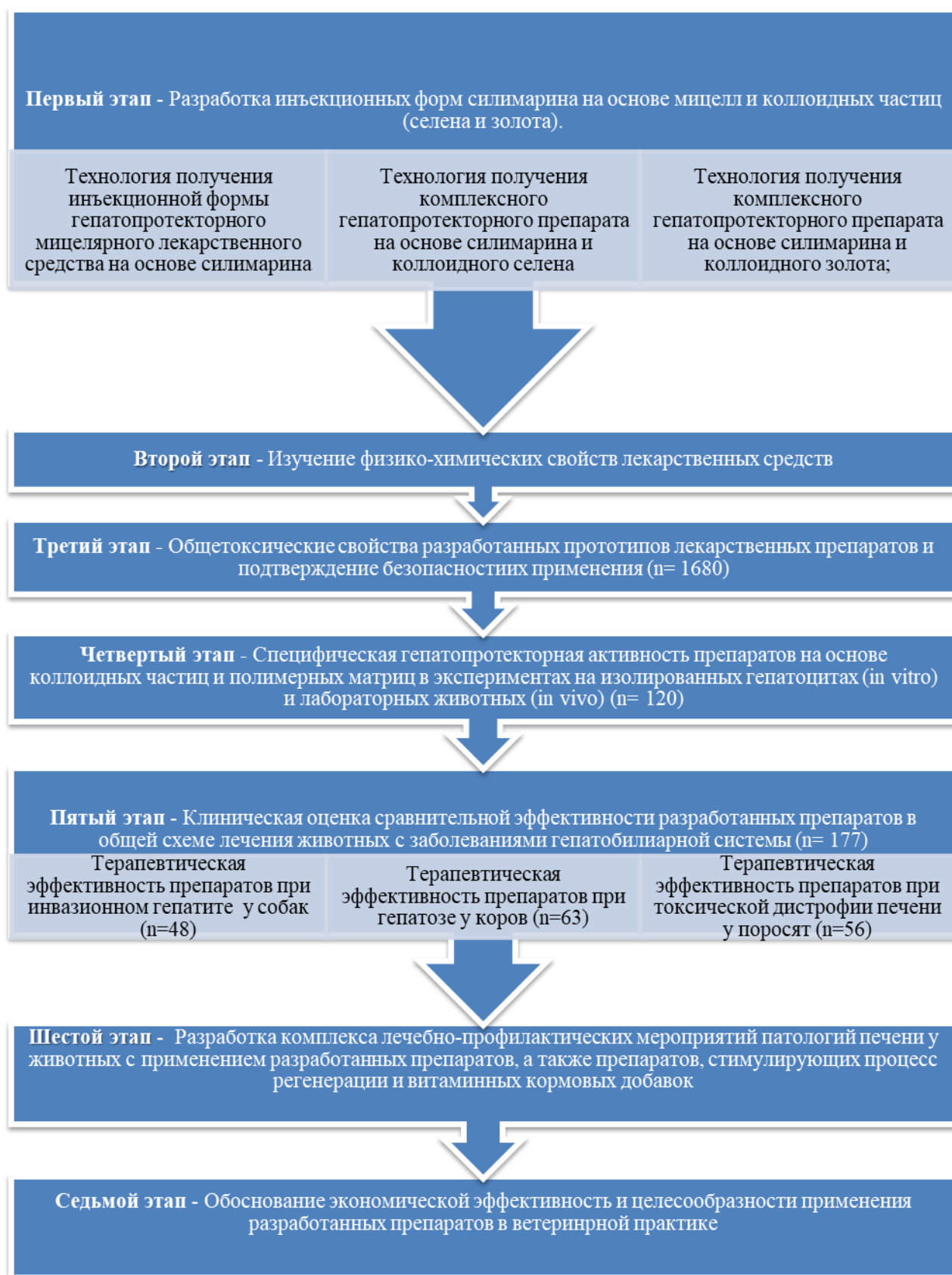


Рисунок 1 – Схема экспериментальных исследований

На первом этапе наших исследований нами были сконструированы

стабильные образцы инъекционных форм силимарина на основе мицелл и наночастиц (селена и золота):

Для конструирования препаратов использовали коммерческий силимарин («TEVA Czech Industries s.r.o.», Чехия).

1. Водно-дисперсный гепатопротекторный препарат, представляющий собой комплекс изомерных биофлавоноидных соединений - флаволигнанов, выделяемые из лекарственного растения расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.). В качестве активнодействующего вещества исследуемый препарат содержит силимарин – 12 мг, дополнительного активнодействующего вещества витамин Е – 2 мг, в качестве органического растворителя 1-метил-2-пирролидон – 0,22 мл, солюбилизатора кремофор – 0,08 мл, консерванта - бензиловый спирт – 0,01 мл, и соразтворитель - воду для инъекции – до 1 мл.

2. Инъекционный препарат силимарина конъюгированного с наночастицами селена, содержащий в качестве активнодействующих веществ силимарин (концентрация 5,76 мг/мл) и наночастицы селена (0,24 мг/мл).

3. Инъекционный препарат силимарина конъюгированного с наночастицами золота, содержащий в качестве активнодействующего вещества силимарин (концентрация 0,08 мг/мл) и наночастицы золота (164,163 мкг/мл).

Второй этап включал изучение физико-химических свойств разработанных нами лекарственных гепатопротекторов.

Диаметр (d) синтезированных наночастиц измеряли с использованием трансмиссионного электронного микроскопа Libra 120 («Carl Zeiss,» Германия) и методом динамического рассеяния света (ДРС) на анализаторе Zetasizer Nano-ZS («Malvern», Великобритания), как описано (N.G. Khlebtsov, L.A. Dykman, 2010.).

Для анализа концентрации силимарина в полученных препаратах был проведен хроматографический анализ полученных препаратов на жидкостном хроматографе «Стайер», с использованием спектрофотометрического детектора А288, для разделения использовали колонку OnixMonolithic C 18. Были применены следующие условия: длина волны – 288 нм; скорость потока – 0,9 см/мин; объем пробы – 20 мкл; температура проведения анализа - 30°C - 35°C. В

качестве элюента применяли ацетонитрил «Для жидкостной хроматографии» и (1% раствор уксусной кислоты в соотношении 7:3 по объему).

На третьем этапе были проведены исследования по изучению общетоксических свойств разработанных лекарственных препаратов на лабораторных животных и подтверждение безопасности их применения сельскохозяйственным и мелким непродуктивным животным.

Оценку общетоксического действия на лабораторных животных проводили согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 708н от 23.08.2010 г.) и методическим указаниям «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая» (2012). Эксперименты на животных проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986).

Исследования осуществляли согласно утвержденному письменному протоколу и в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП).

В основе дизайна исследования лежат методические указания «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (2005) и «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая» (2012).

Использование лабораторных животных и планирование эксперимента было проведено в соответствии с Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 г. №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» и правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

В эксперименты были включены крысы беспородные.

Поставщик: питомник «Филиал «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Московская область, Солнечногорский район, поселок Андреевка, 49.

Пол: самцы.

Возраст: 2-3 месяца.

Масса: 200-230 г.

Пол: самки.

Возраст: 2-3 месяца.

Масса: 200-230 г.

Мыши белые нелинейные.

Поставщик: питомник «Филиал «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Московская область, Солнечногорский район, поселок Андреевка, 49.

Пол: самцы.

Возраст: 2-2,5 месяца.

Масса: 20 - 25 г.

Пол: самки.

Возраст: 2-2,5 месяца.

Масса: 20 - 25 г.

Животные были разведены специально и ранее не участвовали в опытах. Производитель животных предоставил данные (ветеринарные свидетельства крысы - 250 0501958; 250 № 0502030; мыши - 250 № 0502044) последнего контроля состояния здоровья животных.

Мыши белые линии BALB/C

Поставщик: питомник «Филиал «Андреевка» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»

(ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Московская область, Солнечногорский район, поселок Андреевка, 49.

Линия: Valb/c

Пол: самцы.

Возраст: 2-2,5 месяца.

Масса: 18-20 г.

Животные были разведены специально и ранее не участвовали в опытах. Производитель животных предоставил данные (ветеринарные свидетельства мыши - 250 № 0502044) последнего контроля состояния здоровья животных.

Кролики породы Шиншилла.

Поставщик: СХПК "Пензенский кролик", 442710, Пензенская область, рп Исса, проезд Кузнечный, 13

Пол: самцы.

Возраст: 6 - 7 месяцев.

Масса: 3 -4 кг.

Животные были разведены специально и ранее не участвовали в опытах. Производитель животных предоставил данные (ветеринарные свидетельства) последнего контроля состояния здоровья животных.

Животных содержали в виварии ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ, согласно санитарным правилам и на стандартном рационе в соответствии с Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 г. №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

Крыс и мышей содержали в поликарбонатных клетках по 5 голов в каждой. В качестве подстилки использовали древесные опилки. Крыс содержали отдельно (в отдельных помещениях).

Корм представлял собой сухой брикетированный корм ПК-120 ГОСТ Р 51849-2011 Р.5 (ООО «Лабораторкорм», г. Москва).

Кроликов содержали в клетках размером 486X450X300 мм по 2 головы в каждой. В качестве подстила использовали древесные опилки. Кроликов содержали в отдельном помещении.

Корм представлял собой комбикорм (полнорационный) для кроликов (с травяной мукой) ГОСТ Р 51849-2011 Р.5 (ООО «Южная Корона – БКЗ»).

Вода для питья представляла собой водопроводную воду, которую давали *ad libitum* из стандартных поилок.

Животных содержали в контролируемых условиях:

- температура воздуха 20-22°C;
- относительная влажность 60-70%.

Температуру и влажность воздуха контролировали в каждом помещении ежедневно и показания документировали. Освещение - естественно-искусственное (12 ч свет/12 ч темнота).

Подбор животных в группы проводили произвольно методом «Случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10%. Животных взвешивали на весах PA2102C (OHAUS).

Каждое животное имело отчетливо детектируемую метку (раствором пикриновой кислоты); на этикетке на клетке указано название опыта, его продолжительность, номер группы, количество животных, ответственное лицо и т.д.

Подготовку к опыту животных проводили в соответствии с указаниями ОФС «Аномальная токсичность» ГФ XII. Перед опытом у животных отбирали корм и воду. Через два часа животных взвешивали и распределяли по группам.

Методические особенности отдельных экспериментов описаны в ходе изложения собственных исследований.

На четвертом этапе проводили оценку специфической гепатопротекторной активности разработанных нами препаратов на основе коллоидных частиц и полимерных матриц в экспериментах на изолированных гепатоцитах (*in vitro*) и лабораторных животных (*in vivo*).

Для изучения гепатопротекторных свойств полученных препаратов проводили исследование на культуре изолированных гепатоцитов. Культуры клеток были получены по методике, описанной в «Current Protocols in Cell Biology» (Wiley John. Current Protocols in Cell Biology–USA:Inc, 2003) в нашей модификации.

Выделение гепатоцитов проводили из печени крыс под общим наркозом.

Поместили животное на хирургический лоток и обработали брюшную область марлевым тампоном, смоченным в растворе йода, а затем с марлевым тампоном, смоченным 70% этанола.

Делаем разрез брюшной полости до грудной клетки так, чтобы не порезать диафрагму или любую части кишечника. Кожу живота и мышцы выше грудной полости фиксируем иглами, чтобы открыть брюшную полость органов. Перемещаем кишечник из брюшной полости в левую часть животного, используя марлевый тампон, пропитанный стерильным фосфатно-солевым буфером. Располагаем доли печени так, чтобы воротная вена была легкодоступна. Помещаем два хирургических шва свободно вокруг воротной вены, но не затягиваем. Кровь в это время продолжает течь через систему воротной вены. Вводим хирургический катетер G 20, со скосом иглы вверх, в портал вены дистальнее швов (рисунок 2).

Размер катетера может изменяться в зависимости от размера животного. Обеспечиваем мягкое давление, чтобы подтолкнуть канюли вперед, но не до конца стенки сосуда, так, чтобы верхняя часть была проксимальнее обоих хирургических швов. Ретроградное кровотоечение соблюдается на базе канюли. Проводим перфузию 250 мл бескациевого буфера РВ-1 (13,8 г NaCl (118 mM), 0,7 г KCl (4,7 mM), 0,33 г KН₂РO₄ (1,2 mM), 4,2 г NaHCO₃ (25 mM), 2,0 г глюкоза (5,5 mM), 0,2 г трилон Б (Динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, ЭДТА) (0,5 mM)). Продолжительность перфузии от 10 до 20 мин.

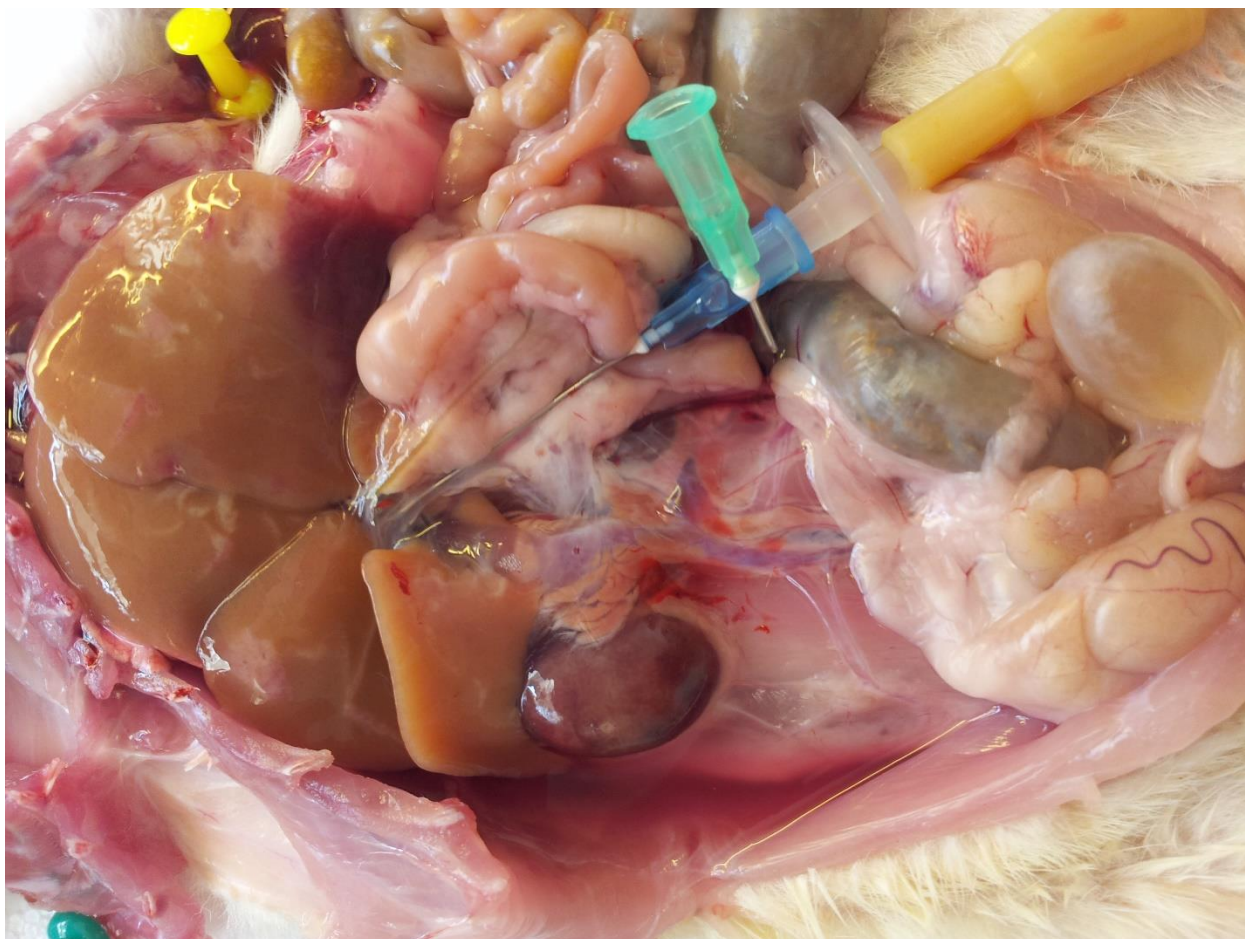


Рисунок 2 – Перфузия печени крысы

Проводим надрез в диафрагме животного, чтобы открыть грудную полость, останавливаем дыхание животного.

После чего переводим на Буфер РВ- 2 (к 4 мл 1,0 М CaCl_2 (2,0 mM) добавляем 2,4 мл 1,0 М MgSO_4 (1,2 mM), доводим до 1 л РВ-1 (без трилона Б), к 250 мг папаина добавляем 500 мл РВ- 2. Продолжаем перфузию буфером, содержащим фермент от 10 до 15 мин.

Удаляем канюлю из воротной вены и переворачиваем животное на грудную клетку, извлекаем печень. После ферментной обработки печень очень мягкая и следующие манипуляции мы проводим с осторожностью. Ткань печени не следует брать непосредственно пинцетом, мы поднимаем ее с помощью хирургического шпателя. Разрезаем соединительную ткань, окружающую печень, удаляем печень из брюшной полости, и помещаем ее в стерильный контейнер (чашку Петри) для обработки. Погружаем печень в Буфер РВ-1 таким образом,

чтобы от 75% до 100% ткани было погружено. После чего измельчаем ее и перетираем через железное сито в 40мл среды ДМЕМ. Центрифугируем в течение 5 минут при 700об/мин. Проводим трехкратную отмывку гепатоцитов в буфере РВ-2 без папаина.

Дальнейшие манипуляции с гепатоцитами проводим в среде ДМЕМ обогащенной эмбриональной сывороткой.

В среду для инкубации которых вносили исследуемые препараты в дозе 0,01 мг/мл по действующему веществу (силимарину) и гепатотоксин (тетрахлорметан) в дозе 2 ммоль.

Дизайн эксперимента представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Дизайн эксперимента по изучению гепатопротекторных свойств *in vitro*

	1 проба (n=6)	2 проба (n=6)	3 проба (n=6)	4 проба (n=6)	5 проба (n=6)	6 проба (n=6)	7 проба (n=6)	8 проба (n=6)
Субстрат, (мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)
	2 ммоль тетрачлорметан							
Анализируемый образец, (0,01 мг/мл)	-	СилимаринМ	СилимаринКС	СилимаринКЗ	-	СилимаринМ	СилимаринКС	СилимаринКЗ
	Инкубируем при 37 ⁰ С 1 час							
	Центрифугируем при 1000 об/мин, 10 мин							
Для определения ферментов цитолиза	150	150	150	150	150	150	150	150
Осадок используем для определения жизнеспособности гепатоцитов в МТТ-тесте								

В качестве гепатотоксина использовали тетрачлорметан (CCl₄). Измерение дыхательной активности изучали по способности клеток восстанавливать нитротетразольный синий до формазана в МТТ-тесте по методике, описанной (Т. Bernas, 2000) Целостность клеточных мембран оценивали по активности трансаминаз (АЛТ, АСТ, ЛДГ) в среде инкубации.

Изучение гепатопротекторных свойств препаратов при индуцированном тетрачлорметаном экспериментальном гепатите у мышей.

Для определения гепатопротекторных свойств исследуемых разработанных нами препаратов были сформированы 5 групп белых нелинейных мышей. Схема опыта представлена в таблице 2.

Первой группе из 20 голов внутривенно вводился 50% р-р четыреххлористого углерода на оливковом масле в объёме 1,22 мл/кг живой массы. Лечение животных этой группы не проводили. Эвтаназию 10 голов осуществлялся через сутки после инъекции, следующих 10 голов осуществлялся на 6 день эксперимента.

Второй группе из 10 голов после введения четыреххлористого углерода проводилась терапия гепатита препаратом силимарина на основе полимерных матриц ежедневно со второго по шестой день.

Третьей из 10 голов после введения четыреххлористого углерода проводилась терапия гепатита лекарственным препаратом силимарина конъюгированного с коллоидным селеном ежедневно со второго по шестой день.

Четвертой группе из 10 голов после введения четыреххлористого углерода проводилась терапия гепатита препаратом силимарина конъюгированного с коллоидным золотом ежедневно со второго по шестой день.

Пятой группе (фоновой) - инъекции не проводились.

Объём четыреххлористого углерода для провокации гепатита вводился в 50% летальной дозе.

Эвтаназию животных осуществляли методом транслокации шейных позвонков под эфирным наркозом, с последующим взятием биологических материалов. Схема опыта представлена в таблице 2

Таблица 2 - Схема опыта по изучению гепатопротекторных свойств препаратов при индуцированном тетрахлорметаном экспериментальном гепатите у мышей

Сроки	Группа 1 (n=20) (Положительный контроль)	Группа 2 (n=10)	Группа 3 (n=10)	Группа 4 (n=10)	Группа 5 (n=10) (Отрицательный контроль)
день 0	Взвешивание животных. Введение трихлорметана в оливковом масле в соотношении 50:50, в объеме 2 мл /кг				Взвешивание животных
день 1	Взвешивание животных. Умерщвление 10 голов для оценки физиологических параметров мышей*	Взвешивание животных. Введение «СилимаринМ» (доза - 1 мг/кг по силимарину, кратность - 1 раз в день, курс - 6 дней)	Взвешивание животных. Введение препарата «СилимаринКС» (доза - 1 мг/кг по силимарину, кратность - 1 раз в день, курс - 6 дней)	Взвешивание животных. Введение препарата «СилимаринКЗ» (доза - 1 мг/кг по силимарину, кратность - 1 раз в день, курс - 6 дней)	Взвешивание животных.
	Взвешивание животных. При гибели 50% мышей в первой опытной группе (положительный контроль). Эвтаназия для оценки физиологических параметров мышей*				
	*Процедура оценки физиологических параметров				
1	Эвтаназия методом транслокации шейных позвонков Взятие крови в пробирку с активатором свертывания для определения биохимических показателей.				
2	Извлечение печени. Оценка массы печени.				
3	Для определения концентрации восстановленного глутатиона растворить 1 г печени в 10 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты				

Глутатион определяли по методике, описанной Liu M.Y (2011).

На пятом этапе нами проведены научно-производственные эксперименты по изучению терапевтической эффективности разработанных лекарственных препаратов силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц при гепатозе у коров. При токсической дистрофии у поросят начального периода дорастивания. Изучена терапевтическая эффективность при лечении собак с вторичным инвазионным гепатитом.

Научно-производственные эксперименты по изучению терапевтической эффективности разработанных препаратов силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц при гепатозе у коров выполнялись в КФХ «Давыдов», Петровского района Саратовской области.

Коров с признаками гепатоза разделили на 4 группы 3 опытных и 1 контрольную. Критериями включения в группу явились характерные признаки дистрофического поражения печени (таблица 3).

Таблица 3 - Дизайн эксперимента по определению терапевтической эффективности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц

Группа	Терапевтическое средство	Способ применения	Курс (дни)	Общее количество животных
1	Антитокс (препарат сравнения)	Внутримышечно	1 раз в день, 7 дней	16
2	Базовая терапия + Исследуемый препарат (СилимаринМ)	Внутримышечно	1 раз в день, 7 дней	16
3	Базовая терапия + Исследуемый препарат (СилимаринКС)	Внутримышечно	1 раз в день, 7 дней	16
4	Базовая терапия + Исследуемый препарат (СилимаринКЗ)	Внутримышечно	1 раз в день, 7 дней	15

Оценку терапевтической эффективности препаратов силимарина на основе наночастиц (селена и золота) и полимерных матриц при лечении собак с вторичным инвазионным гепатитом выполняли в ветеринарной клинике Doctor vet, г. Саратов.

В исследование были включены 48 собак с диагнозом острый вторичный (бабезиозный) гепатит (32 самца и 16 самок в возрасте от 8 мес., до 6 лет разных пород, живой массой от 1,0 до 17,0 кг) пришедшие на прием в ветеринарную клинику.

Критерием отбора в группу для исследований являлось наличие симптомов поражения гепатобилиарной системы и установленного на основании клинико-лабораторных исследований диагноза бабезиоз, гепатит.

После включения в исследование собак взвесили и сформировали 12 блоков по 4 животных в каждом. Последовательно основанных на весе тела, возрасте и клинических симптомах заболевания. Которых в произвольном порядке распределили в одну из 4 групп (таблица 4).

Таблица 4 - Дизайн эксперимента по определению терапевтической эффективности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц при вторичном гепатите у собак

Лечебная группа	Схема лечения препарат	Способ применения	Объем, кратность, курс	Общее количество животных
1	Базовая терапия + Гепатоджект (препарат сравнения)	внутримышечно	2-5 мл, 1 раз в день, 7 дней	12
2	Базовая терапия + Исследуемый препарат (СилимаринМ)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	12
3	Базовая терапия + Исследуемый препарат (СилимаринКС)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	12
4	Базовая терапия + Исследуемый препарат (СилимаринКЗ)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	12

Животные всех групп получали одинаковую базовую терапию.

Животным первой опытной группы в качестве гепатопротекторного препарата назначали коммерческий препарат сравнения Гепатоджект внутримышечно, 2 раза в день - 7 дней.

Животным второй опытной мицеллярный силимарин из расчета 0,1 мл/кг массы тела, в/м 1 раз в день 7 дней

Животным третьей опытной группы силимарин конъюгированный с наночастицами селена из расчета 0,1 мл/кг массы тела, в/м 1 раз в день 7 дней.

Животным четвертой опытной группы силимарин конъюгированный с наночастицами золота из расчета 0,1 мл/кг массы тела, в/м 1 раз в день 7 дней.

Испытания препаратов силимарина на основе наночастиц и полимерных матриц при токсической дистрофии у поросят.

Для этого было сформировано 4 группы поросят начального периода доразивания в возрасте 35 – 40 дней, по 14 животных в каждой, с признаками токсической дистрофии печени. Живая масса на начало эксперимента составила 12-14 кг (таблица 5).

Таблица 5 - Дизайн эксперимента по определению терапевтической эффективности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц при токсической дистрофии у поросят

Лечебная группа	Схема лечения препарат	Способ применения	Объем, кратность, курс	Общее количество животных
1	Базовая терапия + Гепатоджект (препарат сравнения)	внутримышечно	2-5 мл, 1 раз в день, 7 дней	14
2	Базовая терапия + Исследуемый препарат (СилимаринМ)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	14
3	Базовая терапия + Исследуемый препарат (СилимаринКС)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	14
4	Базовая терапия + Исследуемый препарат (СилимаринКЗ)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	14

Животным первой опытной группы в качестве гепатопротекторного препарата назначали коммерческий препарат сравнения Гепатоджект внутримышечно, 2 раза в день - 7 дней.

Животным второй опытной мицеллярный силимарин (СилимаринМ) из расчета 0,1 мл/кг массы тела, в/м 1 раз в день 7 дней

Животным третьей опытной группы силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) из расчета 0,1 мл/кг массы тела, в/м 1 раз в день 7 дней.

Животным четвертой опытной группы силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) из расчета 0,1 мл/кг массы тела, в/м 1 раз в день 7 дней.

На шестом этапе нашей работы нами проведена апробация новой мицеллярной инъекционной формы на основе метилурацила (заявка на изобретение RU 2015122674, решение о выдаче патента 13.03.2017 г.) в разработке которого мы принимали непосредственное участие. А также

витаминовой кормовой добавки «Волстар» в схеме лечения токсической дистрофии печени у поросят. На основании полученных результатов разработан комплекс лечебно-профилактических мероприятий патологий печени у животных с применением инъекционных лекарственных форм препаратов силимарина, а также препаратов, стимулирующих процесс регенерации и витаминных кормовых добавок.

Апробация новой мицеллярной инъекционной формы на основе метилурацила и витаминной кормовой добавки «Волстар» (ООО «НВЦ Агроветзащита» (Россия)), в схеме лечения токсической дистрофии печени у поросят (таблица 6).

Таблица 6 - Дизайн эксперимента по определению терапевтической эффективности комплексной схемы лечения поросят при токсической дистрофии печени

Лечебная группа	Схема лечения препарат	Способ применения	Объем, кратность, курс	Общее количество животных
1	Исследуемый препарат (Силимарин конъюгированный наночастицами селена)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	14
2	Силимарин конъюгированный наночастицами селена (Исследуемый препарат)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	14
	Мицеллярный Метилурацил	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	
	Волстар (витаминовая кормовая добавка)	орально с питьевой водой	0,5 мл, 1 раз в день, 5 дней	

Для этого нами было сформировано 2 группы поросят начального периода дорастивания в возрасте 35 – 40 дней, по 14 животных в каждой, с признаками токсической дистрофии печени. Живая масса на начало эксперимента составила 12-14 кг.

Поросятам первой опытной группы назначали силимарин

конъюгированный с наночастицами селена (который показал наилучшую терапевтическую эффективность в предыдущих наших опытах) из расчета 0,1 мл/кг массы тела, в/м 1 раз в день 7 дней.

Второй группе наряду с гепатопротекторным препаратом применяли мицеллярный Метилурацил в дозе 2 мг/кг (0,1 мл/кг по объему), 1 раз в день 7 дней и Волстар из расчета 0,5 мл на 10 кг с водой 5 дней.

Изучение профилактической эффективности патологий печени у животных комплексной схемы проводили на поросятах начального периода дорастивания в возрасте 35 – 40 дней (таблица 7).

Таблица 7 - Схема эксперимента по изучению комплекса профилактических мероприятий патологий печени у животных с применением разработанных препаратов, а также препаратов, стимулирующих процесс регенерации и витаминных кормовых добавок

Лечебная группа	Схема лечения препарат	Способ применения	Объем, кратность, курс	Общее количество животных
1	Силимарин конъюгированный с наночастицами селена (Исследуемый препарат)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в 7 дней, двукратно	30
	Мицеллярный «Метилурацил»	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в 7 дней, двукратно	
	Волстар (витаминная кормовая добавка)	орально с питьевой водой	0,5 мл, 1 раз в день, 3 дня	
2	Контрольная			30

Комплексная схема включала применение разработанных нами препаратов:

Двукратное введение препарата силимарина в дозе 0,1 мл/кг, до отъема и через 7 суток после отъема.

В те же сроки введение инъекционного метилурацила в дозе 0,1 мл/кг.

И выпаивание с водой витаминного комплекса «Волстар» с первых суток после отъема, в дозе 0,5 мл/кг, 3 дня.

Седьмой этап включал обоснование экономической эффективности и целесообразности применения разработанных препаратов в ветеринарной практике.

Методы исследований

Гематологические исследования крови проводили на гематологическом анализаторе MicroCC-20Vet, НТИ(США).

Для оценки функционального состояния печени использовались следующие биохимические показатели: уровень общего белка и его фракций сыворотки крови, глюкозу, общий и прямой билирубин.

Ферментный спектр крови включал определение активности аланиновой (АЛТ) и аспарагиновой аминотрансфераз (АСТ), щелочной фосфатазы. Глубину повреждения гепатоцитов оценивали, рассчитывая коэффициент де Ритиса (отношение активности АСТ к АЛТ). Биохимические исследования проводили на биохимическом анализаторе «StatFax 3300», с помощью стандартных наборов реагентов ЗАО «Диакон ДС». Для проверки правильности и точности определения биохимических показателей в сыворотке крови животных, использовали контрольную сыворотку для биохимических исследований по ТУ 9398-022-09807247-2009, ООО «HOSPITEX DIAGNOSTICS».

Клеточный материал для цитологического исследования печени получали при помощи чрез кожной цитопункции тонкой иглой G16.

При проведении цитопункции животное фиксировали в стоячем или в левом боковом лежащем положении в зависимости от его темперамента и от выбранной методики доступа. При нормальных размерах печени применяли различные трансторакальные доступы, при осуществлении которых иглу вводили справа по заднему краю последнего или 2-х последних ребер на расстоянии 1-4 см от мечевидного отростка (в зависимости от размера животного) перпендикулярно поверхности кожи на глубину 2-4 см в дорсальном направлении. При увеличении размеров печени иглу вводили непосредственно позади мечевидного отростка или слева между мечевидным отростком и реберной дугой на ту же глубину в дорсальном или дорсо-каудальном направлении. Одновременно с прокалыванием

паренхимы печени с помощью шприца создавали пониженное давление, что позволяло удерживать в игле, при ее быстром извлечении наружу захваченные клетки. Полученный клеточный материал с помощью малого объема физиологического раствора вымывали на предметное стекло. Высушивали на воздухе затем окрашивали по Романовскому Гимзе при помощи набора красителей Лейкодиф 200.

Измерение концентраций железа и общей железосвязывающей способности сыворотки (ОЖСС) проводили на биохимическом анализаторе «ВА-88А Mindray», с помощью стандартного набора реагентов для определения концентрации железа (с Ференом) в сыворотке, плазме крови по ТУ 9398-030-09807247-2009 и набора реагентов для определения общей железосвязывающей способности сыворотки крови по ТУ 9398-050-09807247-2010, ООО «HOSPITEX DIAGNOSTICS». Для проверки правильности и точности определения железа и ОЖСС в сыворотке крови поросят, использовали контрольную сыворотку для биохимических исследований по ТУ 9398-022-09807247-2009, ООО «HOSPITEX DIAGNOSTICS».

Концентрацию глутатиона определяли по методике, описанной (M.Y. Liu, 2010).

Для определения концентрации глутатиона, печень извлекалась и гомогенизировалась в 10% трихлоруксусной кислоте из расчёта 10 мл на 1 г печени. Взвесь печени центрифугировали при 3000 об/мин в течении 15 минут. К 500 мкл супернатанта, добавляли 2 мл 0.3 М раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 200 мкл 5,50 –dithiobis (2-nitrobenzoic acid) в 1% sodium citrate (0,4 мг/мл). Спектр поглощения измеряли при 412 нм, на спектрофотометре Genesis 10S-UV-VIS (USA). В качестве стандарта использовали глутатион (Sigma).

Концентрацию малонового диальдегида определяли (МДА) в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметилового комплекса (ТМК), имеющего максимум поглощения при 532 нм, на спектрофотометре Genesis 10S-UV-VIS (USA).

Активность глутатионпероксидазы определяли по методике, описанной (В.С. Бузлама и др., 1997).

Определение концентрации ферритина в сыворотке крови коров проводили методом твердофазного иммуноанализа с применением фаговых и поликлональных антител (любезно предоставленных научным сотрудником ИБФРМ РАН Фоминым А.С.) по методике описанной (The usage of phage mini-antibodies as a means of detecting ferritin concentration in animal blood serum / Staroverov S.A., Fomin A.S., Mezhenyuy P.V., Kozlov S.V., Larionov S.V., Guliy O.I., Volkov A.A., Dykman L.A., Laskavuy V.N., Fedorov M.V. // Journal of Immunoassay and Immunochemistry. 2015. Т. 36. № 1. С. 100-110.).

Статистическую обработку полученных результатов по динамике прироста массы тела, оценке изменений гематологических и биохимических показателей сыворотки крови, показателей мочи и значений интегральных показателей проводили по стандартным процедурам, с помощью приложения Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp. USA) и пакета статистического анализа данных StatPlus 2009 professional 5.8.4 for Windows (StatSoft Inc., USA), с использованием *t*-критерия Стьюдента для оценки достоверности различий между выборками для опытных и контрольных экспериментов. По результатам вычисления среднеарифметического (*M*) и стандартного отклонения ($\pm SD$) для выборки определяли стандартную ошибку среднеарифметического ($\pm SEM$) и границы его доверительного интервала с учетом коэффициента Стьюдента $t(n, p)$ при уровне значимости 95 % ($p = 0,05$) и числе измерений *n*.

Оценку достоверности различий между средними значениями в опытных и контрольных экспериментах проводили по величине *p*-value в варианте двух-выборочного непарного *t*-теста (two-sample unpaired *t*-test) с неравными дисперсиями.

Различия принимали достоверными при выполнении неравенства $p \geq 0,05$. Кроме того, в этих случаях контролировали также соблюдение неравенства $t, t(n, p)$ при $n = (df + 1)$ (где *df* – число степеней свободы), $p = 0,05$, где $t = |x_1 - x_2| /$

$(s_1^2+s_2^2)^{1/2}$, x_1 и x_2 – среднеарифметические значения, s_1 и s_2 – их стандартные ошибки для двух выборок экспериментальных данных.

Значения LD_{50} и других параметров острого токсического действия определяли пробит-анализом (D.J. Finney, 1971); для статистического сравнения полученных значений LD_{50} использовали тест линейности, тест параллелизма и тест равенства дисперсий (D.J. Finney, 1982)

3.2 Результаты исследований и их анализ

3.2.1 Технология получения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц

Технология получения мицеллярного раствора силимарина

В плоскодонную колбу объемом 250 мл, на водяной бане при температуре 45⁰С, снабженную магнитной мешалкой, делительной воронкой, дефлегматором помещают 1,2 г силимарина, 0,2 г витамина Е, 22 мл солюфора (2-пирролидон), 1 мл бензилового спирта и перемешивают до полного растворения поддерживая температуру водяной бани на 45⁰С. Далее в колбу вносят 8 мл кремофора ЕL и перемешивают на протяжении 20 минут.

Далее через делительную воронку равномерно по каплям, при постоянном интенсивном перемешивании (от 700-1000 об/мин) вносят дистиллированную воду, нагретую до 45 ⁰С в реакционную среду со скоростью 3 мл в минуту, добавляют 69 мл дистиллированной воды и перемешивают на протяжении 30 минут.

Далее останавливают перемешивание и герметично закрывают в колбе оставляя в водяной бане остывать.

Дальнейшие манипуляции проводят в стерильных условиях в ламинар-боксе. Полученный раствор при достижении комнатной температуры перемещают в ламинар-бокс и фильтруют через фильтр номиналом 0,45 мкм (для стерилизации и избавления от микропримесей) и расфасовывают в стерильные стеклянные флаконы, которые герметично закрывают резиновыми крышками с металлическим колпачком.

Технология получения препарата силимарина конъюгированного с наночастицами селена

Конструирование препарата силимарина конъюгированного с наночастицами селена выполняли по следующей методике: к 0,01М раствору L - цистеина (молекулярная масса – 121,16 г/моль) при постоянном перемешивании при комнатной температуре добавляли по каплям 0,001М раствор селенистой кислоты (АО «УЗПХ», Россия) (H_2SeO_3 , молекулярная масса – 129 г/моль) в соотношении объемов 1:1.

Затем при постоянном перемешивании при комнатной температуре 0,01М раствор силимарина по каплям добавляли к раствору L-цистеина и селенистой кислоты.

Для приготовления 100 мл раствора L – цистеина брали навеску аминокислоты, равную 0,12116 грамм, растворяли в 100 мл дистиллированной воды.

Для приготовления 100 мл раствора селенистой кислоты брали навеску, равную 0,0129 граммам, растворяли в 100 мл дистиллированной воды.

Так как силимарин не растворим в воде, был приготовлен 0,01М раствор силимарина на 0,1 М растворе гидроксида натрия.

Молекулярная масса силимарина (в пересчете на силибинин) – 482,44 г/моль. Для приготовления 0,01 М раствора силимарина брали навеску, равную 0,48 грамм и растворяли в 100 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида.

Растворы готовились с учетом правил приготовления молярных растворов.

Технология получения препарата силимарина конъюгированного с наночастицами золота

Препарат силимарина конъюгированного с коллоидным золотом был получен по следующей методике: к 100 мл 1мМ раствора хлороводородной кислоты ($HAuCl_4$) при комнатной температуре и постоянном перемешивании добавляли по каплям 20 мл 1 мМ раствора силимарина на 0,1М растворе натрия

гидроксида (NaOH). Оставляли перемешиваться при указанных выше условиях в течение четырех часов.

Для приготовления 0,1М раствора NaOH брали навеску натрия гидроксида, равную 400 мг, и растворяли в 100 мл MQ воды (деионизированная дистиллированная вода).

Для приготовления 100 мл 1мМ раствора силимарина брали навеску, равную 0,048244 граммам. Растворяли в 100 мл 0,1М NaOH.

Для синтеза брали раствор 1мМ HAuCl₄.

3.2.2 Физико-химические свойства препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц

Для анализа концентрации силимарина в полученных препаратах был проведен хроматографический анализ.

Определение концентрации силимарина осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Метод основан на жидкостной хроматографии с внешним стандартом.

Аппаратура, материалы, реактивы:

- хроматограф жидкостной типа «Стайер»;
- весы лабораторные;
- колонка Луна С-18 2,0x60 мм;
- цилиндр мерный 50 мл;
- колбы мерные 25 мл;
- стандартный образец силимарина;
- ацетонитрил для жидкостной хроматографии;
- этанол «хч»;
- уксусная кислота (лед.);

1. Приготовление стандартных растворов для определения концентрации силимарина в интервале от 1,5 мг/мл до 6 мг/мл.

Навеску стандартного образца массой 0,1500 г количественно переносят в мерную колбу объемом 25 мл и доводят до метки этанолом, тщательно

перемешивают, получают раствор с концентрацией 6 мг/мл. Из исходного раствора методом разведений готовят еще калибровочный раствор концентрацией 1,5 мг/мл.

Анализируемый раствор №1 готовят разбавлением 5 мл спиртового раствора силимарина и 15 мл этанола. Анализируемый раствор №2 готовят разбавлением 5 мл спиртового раствора силимарина и 5 мл этанола.

2. Приготовление стандартных растворов для определения концентрации силимарина в интервале от 0,05 мг/мл до 0,1 мг/мл.

Навеску стандартного образца массой 0,0100 г количественно переносят в мерную колбу объемом 100 мл и доводят до метки этанолом, тщательно перемешивают, получают раствор с концентрацией 0,1 мг/мл. Из исходного раствора методом разведений готовят еще калибровочный раствор концентрацией 0,15 мг/мл.

Анализируемый раствор анализируют в нативном виде.

Мерные колбы закрывают притертыми пробками. Стандартные растворы хранятся в холодильнике в течении одного месяца.

Проведение анализа.

Условия проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии:

Длина волны – 288 нм

Скорость потока – 0,9 см³/мин

Объем пробы – 20 мкл

Температура проведения анализа - 30°C - 35°C

Элюент – ацетонитрил «для жидкостной хроматографии» - 1% раствор уксусной кислоты в соотношении 2:3 по объему.

В указанных условиях выполняют хроматографию стандартных растворов силимарина. Измеряют площадь пика при времени удерживания 4,5-5,0 мин (зависит от эффективности колонки). По средним параллельных измерений, расхождение между которыми не должно превышать 5% (отн.), строят калибровочный график в координатах площадь пика – концентрация мг/мл. Хроматографию анализируемых образцов проводят аналогично.

По полученному среднему значению двух параллельных измерений (относительное стандартное отклонение которых не должно превышать 5%) из калибровочного графика находят концентрацию силимарина в анализируемом растворе.

В приложениях 1 - 2 представлены результаты хроматографического анализа стандартных растворов силимарина.

Таблица 8 - Данные площади пика при хроматографическом исследовании и концентрации.

Концентрация силимарина, мг/мл	Площадь, mAU*сек
1,5	8366
1,5	8383
1,5	8322
6	33712
6	33690
6	33666



Рисунок 3 - Градуировочный график силимарина.

Результаты высокоэффективной жидкостной хроматографии препаратов силимарина на основе полимерных матриц и наночастиц селена представлены в приложениях 3-4 и в таблице 9.

Таблица 9 - Данные исследуемых объектов (мицеллярный силимарин, силимарин конъюгированный с наночастицами селена)

Наименование образца	Концентрация в хроматографируемом образце, мг/мл	Площадь пика, mAU*сек	Концентрация в исследуемом образце, мг/мл
Мицеллярный силимарин, 12 мг/мл	3,14	17611	12,57
Силимарин конъюгированный с наночастицами селена, 5,7 мг/мл	2,83	15887	5,67

Для анализа концентрации силимарина в препарате с наночастицами золота была проведена дополнительная градуировка исходя из предполагаемых концентрации действующего вещества (Приложения 5-6).

На основании которых был построен градуировочный график (рисунок 4, таблица 10-11).

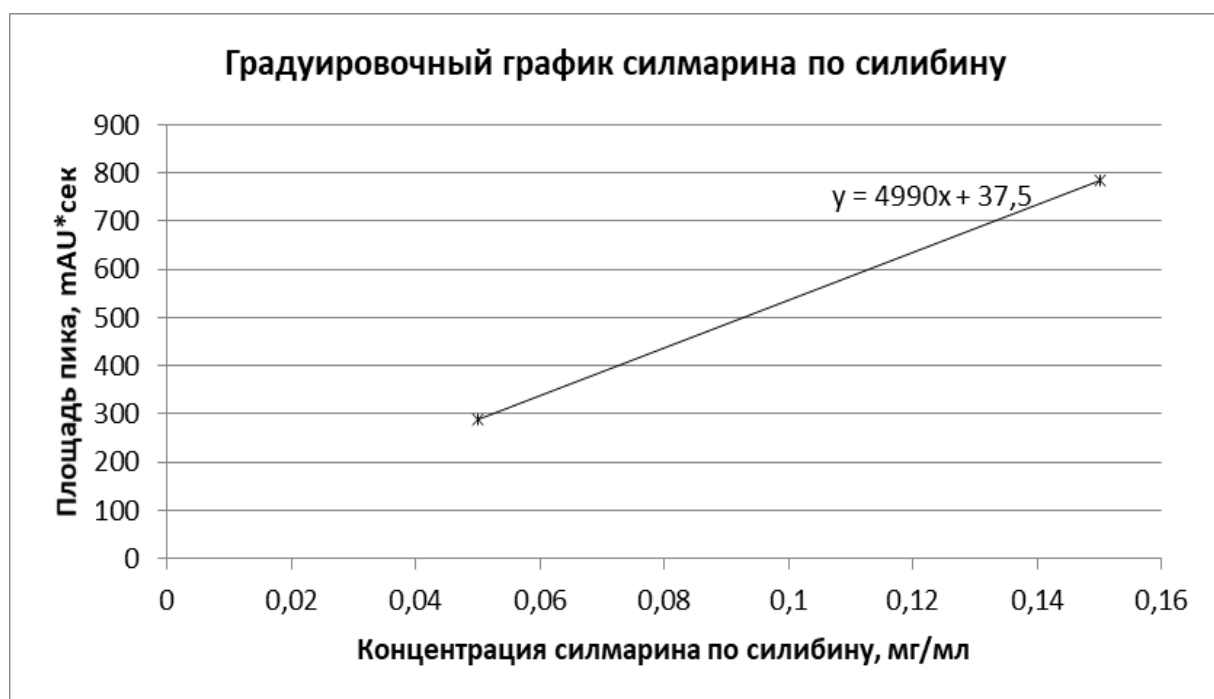


Рисунок 4 – Градуировочный график

Таблица 10 - Данные площади пика при хроматографическом исследовании и концентрации стандартных образцов силимарина

Концентрация силимарина, мг/мл	Площадь, mAU*сек
0,15	786
0,15	770
0,15	802
0,05	287
0,05	276
0,05	291

Результаты высокоэффективной жидкостной хроматографии препарата силимарина конъюгированного с наночастицами золота представлены в приложении 7 и в таблице 11.

Таблица 11 - Данные площади пика при хроматографическом исследовании препарата силимарина конъюгированного с наночастицами золота.

Наименование образца	Концентрация в хроматографируемом образце, мг/мл	Площадь пика, mAU*сек	Концентрация в исследуемом образце, мг/мл
Силимарин конъюгированный с наночастицами золота, 0,08 мг/мл	0,075	337	0,075

Таким образом, в результате проведенного анализа установлено, что в водно дисперсионном растворе силимарина (СилимаринМ), концентрация действующего вещества составила 12 мг/мл, в препарате силимарина конъюгированного с наночастицами селена (СилимаринКС) - 5,76 мг/мл, в препарате силимарина конъюгированного с наночастицами золота (СилимаринКЗ) - 0,08 мг/мл, что соответствует количеству вносимой в препараты субстанции.

Далее нами был определен диаметр (d) синтезированных наночастиц методом динамического рассеяния света (ДРС) на анализаторе Zetasizer Nano-ZS («Malvern», Великобритания) (Рисунок 5).

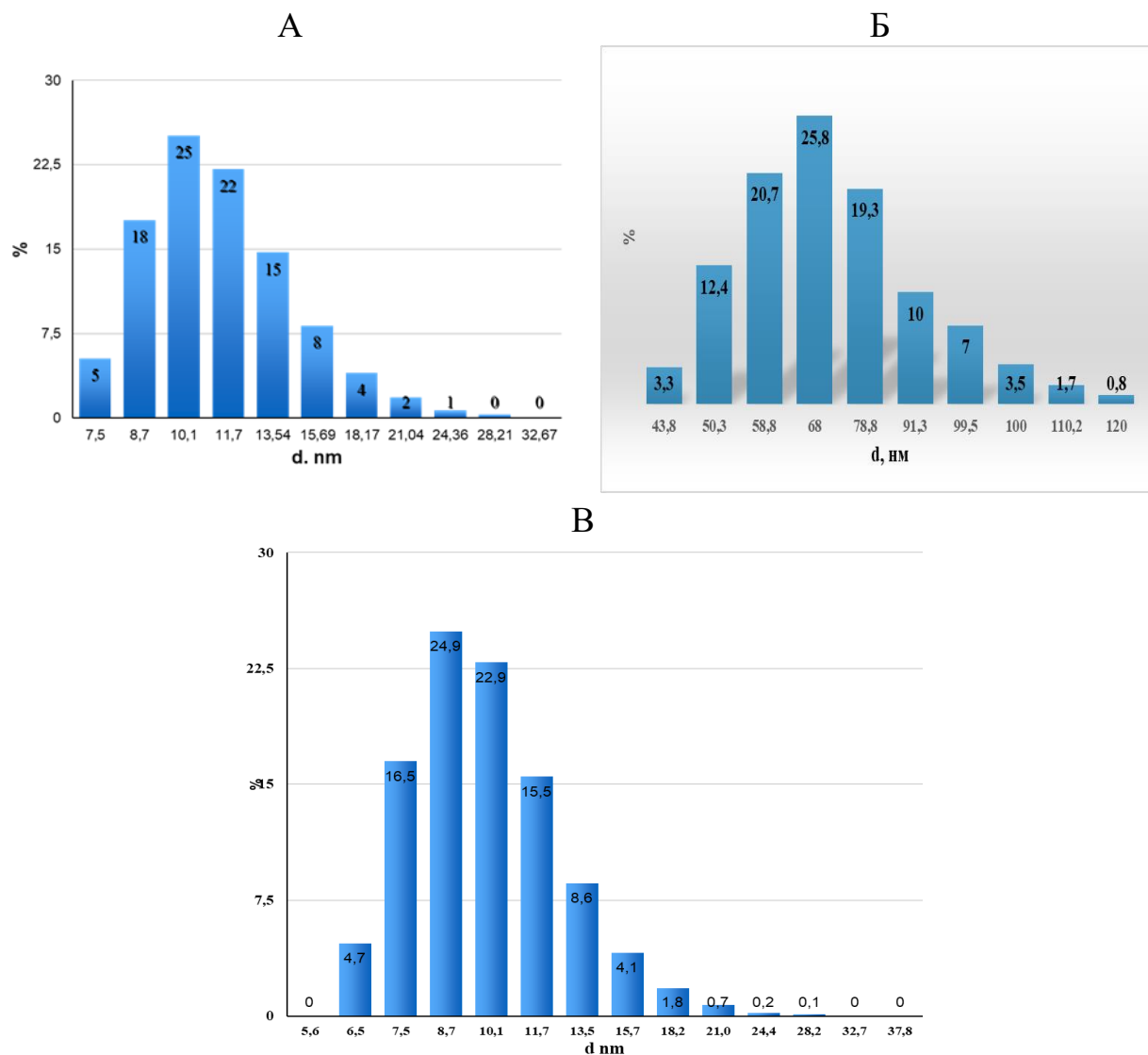


Рисунок 5 - Распределение наночастиц по размерам в препаратах СилимаринМ (А), СилимаринКС (Б) и СилимаринКЗ (В) по данным определения динамического рассеяния света (анализатор Zetasizer Nano-ZS, «Malvern», Великобритания).

Согласно данным, полученным методом ДРС, размер частиц в водно дисперсионном растворе силимарина составил от 7,5 до 21 нм, в препарате силимарина конъюгированного с наночастицами селена 43 -110 нм и в препарате силимарина конъюгированного с наночастицами золота был получен наименьший размер частиц от 6,5 до 21 нм.

Диаметр наночастиц в препаратах силимаринана конъюгированных с наночастицами селена и золота определяли с использованием трансмиссионного электронного микроскопа (ТЕМ) Libra 120 (Carl Zeiss, Germany). Результаты представлены на рисунке 6.

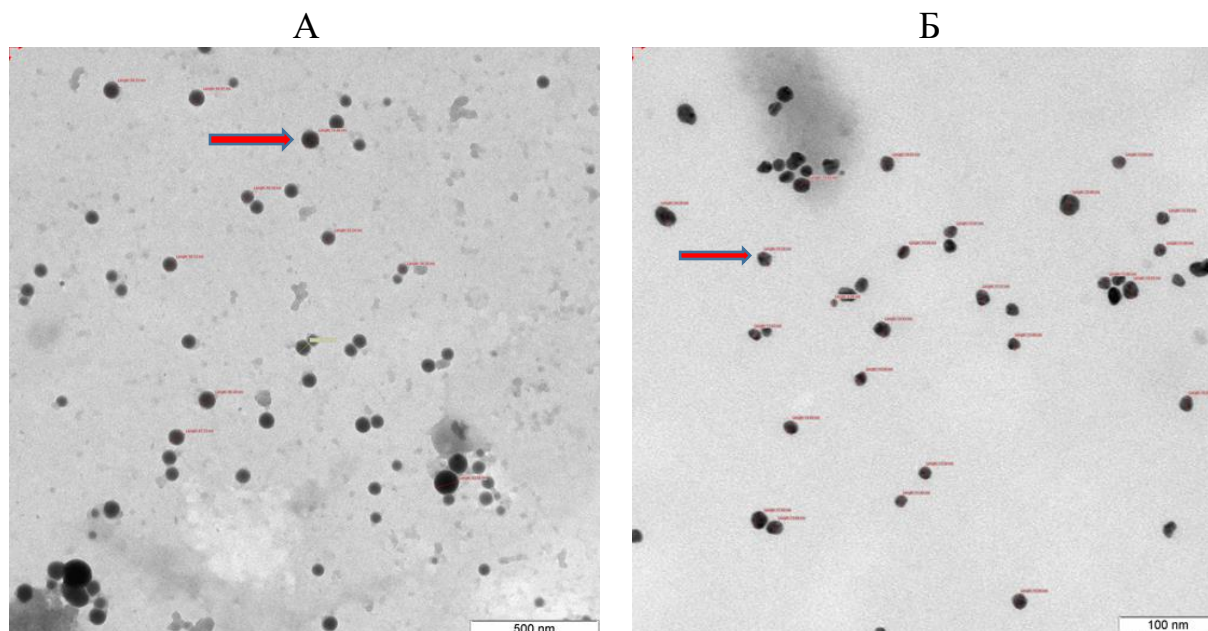


Рисунок 6 - Электронно-микроскопическое изображение наночастиц (отмечены стрелками) в конъюгате силимарина с селеном (А) и силимарина с золотом (Б) (наночастицы отмечены стрелками).

Результаты трансмиссионной электронной микроскопии подтвердили данные полученные в ходе определения диаметра методом динамического рассеяния света.

Таким образом, достигнутая стабилизация коллоидных систем селена и золота с силимарином сопровождается высокой дисперсностью (уменьшением значений d), характерным для коллоидных систем подобного типа.

Наряду с этим, анализ преципитата на ZetasizerNanoZS показал, что дзета-потенциал системы водно-дисперсионного препарата силимарина равен- 43,9 мВ, силимарина с селеном - 31,4 мВ и силимарина с золотом - 40,8 мВ, что свидетельствует о достаточно высокой стабильности всех образцов.

3.2.3 Общетоксические свойства препаратов силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц

Оценка острой токсичности

Целью настоящих исследований явилась оценка острой токсичности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на мышах при внутрижелудочном и внутривентральном введении.

Объектом исследования служили разработанные нами препараты:

- водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ);
- силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС);
- силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ).

Настоящее исследование является доклиническим изучением безопасности новых лекарственных средств. Исследования, которые проводят на лабораторных животных, предоставляют наиболее полную информацию об острой токсичности лекарственного препарата, который предлагается для применения у домашних животных.

Дизайн и организация исследования направлены на решение поставленной цели и базируются на общих принципах организации исследований по оценке острой токсичности лекарственных препаратов на лабораторных животных (таблица 12).

Таблица 12 - Дизайн опыта по острой токсичности

Вид, пол животных	Кол-во животных в группе	Препарат (вариант опыта)	Дозы, кол-во	Объем раствора для введения, мл/животное	Режим введения
мыши- самцы массой 18-20 г	5	«СилимаринМ» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрижелудочно, однократно
мыши- самки массой 18-20 г	5	«СилимаринМ» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрижелудочно, однократно
мыши- самцы массой 18-20 г	5	«СилимаринКС» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрижелудочно, однократно
мыши- самки массой 18-20 г	5	«СилимаринКС» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрижелудочно, однократно
мыши- самцы массой 18-20 г	5	«СилимаринКЗ» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрижелудочно, однократно
мыши- самки массой 18-20 г	5	«СилимаринКЗ» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрижелудочно, однократно
мыши- самцы массой 18-20 г	5	«СилимаринМ» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрибрюшинно, однократно
мыши- самки массой 18-20 г	5	«СилимаринМ» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрибрюшинно, однократно
мыши- самцы массой 18-20 г	5	«СилимаринКС» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрибрюшинно, однократно
мыши- самки массой 18-20 г	5	«СилимаринКС» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрибрюшинно, однократно
мыши- самцы массой 18-20 г	5	«СилимаринКЗ» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрибрюшинно, однократно
мыши- самки массой 18-20 г	5	«СилимаринКЗ» (испытуемый препарат)	Несколько доз	0,1 – 0,5	Внутрибрюшинно, однократно
мыши- самцы массой 18-20 г	10	Раствор натрия хлорида (контроль)		0,5	Внутрижелудочно, однократно
мыши- самцы массой 18-20 г	10	Раствор натрия хлорида (контроль)		0,5	Внутрибрюшинно, однократно

Подбор животных в группы проводили произвольно методом «Случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10%. Животных взвешивали на весах PA2102C (OHAUS).

Каждая группа мышей при внутрибрюшинном введении испытуемого препарата массой 18-20 г состояла из 10 животных (5 самцов, 5 самок).

Масса животных указана на время введения препаратов.

Подготовку к опыту мышей проводили в соответствии с указаниями ОФС «Аномальная токсичность» ГФ XII (Государственная фармакопея Российской Федерации XII, ч. 1, 25. Аномальная токсичность (ОФС 42-0060-07), 2012.). Перед опытом у животных отбирали корм и воду. Через два часа животных взвешивали и распределяли по группам.

Препараты «СилимаринМ», «СилимаринКС» и «СилимаринКЗ» использовали в нативном виде. Для достижения адекватных объемов при внутрибрюшинном и внутривентриальном введении препараты разводили в соответствующем объеме воды для инъекций.

Процедура введения препаратов

При оценке пероральной токсичности испытуемые препараты вводили в желудок белым нелинейным мышам с помощью желудочного зонда.

Расчет доз производили на 100% лекарственную форму. Препарат вводили внутривентриально белым нелинейным мышам в дозах 10000, 20000, 30000 и 40000 мг/кг по лекарственной форме.

Контрольным мышам вводили однократно внутривентриально воду для инъекций в максимально допустимом объеме 0,5 мл.

Учитывая тот факт, что максимальная доза вещества, вводимого в желудок составляет для мышей 0,5 мл, дозы 30000 и 40000 мг/кг вводили дробно с интервалом 4 часа.

При оценке парентеральной токсичности испытуемые препараты вводили белым нелинейным мышам при помощи одноразовых шприцев в брюшную полость.

Расчет доз производили на 100% лекарственную форму. Препарат вводили внутривентриально белым нелинейным мышам в дозах 10000, 20000, 30000 и 40000 мг/кг по лекарственной форме.

Контрольным мышам вводили однократно внутривентриально воду для инъекций в максимально допустимом объеме 0,5 мл.

Учитывая тот факт, что максимальная доза вещества, вводимого в желудок составляет для мышей 0,5 мл, дозы 30000 и 40000 мг/кг вводили дробно с интервалом 4 часа.

Наблюдение за животными проводили в течение 14 дней, в течение первых суток животные находились под непрерывным наблюдением. При наблюдении за животными оценивали и документировали следующие параметры: интенсивность и характер двигательной активности, наличие судорог, координацию движений, реакция на звуковые раздражители, состояние кожи и шерсти, состояние слизистых, частоту дыхательных движений, вид и консистенцию фекальных масс, потребление корма, массу тела.

На 14 день после введения исследуемых препаратов белым нелинейным мышам, провели эвтаназию выживших животных методом транслокации шейных позвонков под ингаляцией эфира. При проведении вскрытия оценивали состояние желудочно-кишечного тракта, печени, почек, поджелудочной железы, проводили взвешивание органов.

Опытных и контрольных животных взвешивали перед введением препарата, а также на 1; 7 и 14 сутки после введения препарата; определяли относительный привес по отношению к исходной массе тела (%).

Результаты введения испытуемых препаратов белым нелинейным мышам-самцам приведены в таблицах 13.1-13.3.

Таблица 13.1 - Результаты исследования острой токсичности после однократного внутрижелудочного введения препарата СилимаринМ белым нелинейным мышам

Вид, пол	Доза препарата (мг/кг)	Число мышей в опыте	Число погибших мышей после однократного введения препаратов в различных дозах через (сутки)								Итоговый результат	
			1	2	3	4	5	6	7	14		
Мыши-самцы	10000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	20000	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3/5
Миши-самки		5	2	0	1	0	0	0	0	0	0	3/5
Мыши-самцы	30000	5	2	1	1	0	0	0	0	0	0	4/5
Миши-самки		5	1	2	1	0	0	0	0	0	0	4/5
Мыши-самцы	40000	5	3	1	1	0	0	0	0	0	0	5/5
Миши-самки		5	3	1	0	0	0	0	0	0	0	4/5

Таблица 13.2 - Результаты исследования острой токсичности после однократного внутрижелудочного введения препарата СилимаринКС белым нелинейным мышам

Вид, пол	Доза препарата (мг/кг)	Число мышей в опыте	Число погибших мышей после однократного введения препаратов в различных дозах через (сутки)								Итоговый результат	
			1	2	3	4	5	6	7	14		
Мыши-самцы	10000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	20000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	30000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	40000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Таблица 13.3 - Результаты исследования острой токсичности после однократного внутрижелудочного введения препарата СилимаринКЗ белым нелинейным мышам

Вид, пол	Доза препарата (мг/кг)	Число мышей в опыте	Число погибших мышей после однократного введения препаратов в различных дозах через (сутки)								Итоговый результат	
			1	2	3	4	5	6	7	14		
Мыши-самцы	10000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	20000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	30000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	40000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	Контроль	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки	Контроль	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Как следует из данных таблицы, введение водно-дисперсионной формы силимарина в дозе 10000 мг/кг по лекарственной форме не привело к гибели животных. Вместе с этим, сразу после введения препарата у отмечали угнетение, мыши были гиподинамичны отмечали нарушение груминга. Данные симптомы купировались в течение 1-2 часов после введения. В последующем мыши не отличались от контрольных.

Дозы 20000, 30000 и 40000 мг/кг по лекарственной форме. Животные угнетены, движения некоординированы. У некоторых животных отмечались клонические судороги. Отказ от корма в течение 1-3 суток после введения препарата. Тремор, нарушение груминга. Смерть наступала в течение первых трех суток после введения препарата. У выживших животных гиподинамия отмечалась на протяжении 6 -7 суток, мыши плохо потребляли корма.

В результате введения испытуемого препарата силимарина конъюгированного с наночастицами селена «СилимаринКС» белым нелинейным

мышам как самцам, так и самкам в дозах 10000, 20000, 30000 и 40000 мг/кг по лекарственной форме не привело к гибели животных.

У животных которым вводили внутривенно препарат «СилимаринКС» в дозах 10000 и 20000 мг/ кг массы тела по лекарственной форме симптомов интоксикации не наблюдалось. Вместе с этим, у белых нелинейных мышей после введения препарата в дозах 30000 и 40000 мг/кг отмечали угнетение, животные больше лежали, были гиподинамичны, отмечали нарушение груминга. Данные симптомы купировались в течение 1-2 часов после введения. В последующем мыши не отличались от контрольных.

В результате введения испытуемого препарата силимарина конъюгированного с наночастицами золота «СилимаринКЗ» белым нелинейным мышам как самцам, так и самкам в дозах 10000, 20000, 30000 и 40000 мг/кг по лекарственной форме, также, как и введение препарата «СилимаринКС» не привело к гибели животных.

У животных которым вводили внутривенно препарат «СилимаринКЗ» в дозах 10000 и 20000 мг/ кг массы тела по лекарственной форме симптомов интоксикации не наблюдалось. Вместе с этим, у белых нелинейных мышей после введения данного препарата в дозах 30000 и 40000 мг/кг отмечали угнетение, животные больше лежали, были гиподинамичны, отмечали нарушение груминга. Данные симптомы купировались в течение 1-2 часов после введения. В последующем мыши не отличались от контрольных.

При вскрытии павших мышей отмечали следующее: печень увеличена, сосуды печени кровенаполнены. Селезёнка увеличена, дряблая. Сосуды мягкой мозговой оболочки кровенаполнены, отек головного мозга. Легкие мышей темно-красные, с синюшным оттенком и светлыми участками, тестоватой консистенции. Кровеносные сосуды переполнены кровью. Почки увеличены, гиперемированы, отмечаются точечные кровоизлияния.

В контрольной группе животных, которым вводили воду для инъекций в максимально допустимых объемах, падежа и признаков интоксикации не отмечалось.

Аналогичные изменения наблюдались при однократном парентеральном введении препаратов на основе наночастиц (селена и золота) и полимерных матриц. Данные представлены в таблице 14.1-14.3.

Данные по динамике прироста массы тела у мышей после однократного внутрижелудочного введения препаратов «СилимаринМ», «СилимаринКС» и «СилимаринКЗ» приводятся в таблице 15.

Таблица 14.1 - Результаты исследования острой токсичности после однократного внутрибрюшинного введения препарата СилимаринМ белым нелинейным мышам

Вид, пол	Доза препарата (мг/кг)	Число мышей в опыте	Число погибших мышей после однократного введения препаратов в различных дозах через (сутки)								Итоговый результат	
			1	2	3	4	5	6	7	14		
Мыши-самцы	10000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	20000	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	3/5
Миши-самки		5	2	1	1	0	0	0	0	0	0	4/5
Мыши-самцы	30000	5	2	1	1	1	0	0	0	0	0	5/5
Миши-самки		5	1	2	1	0	0	0	0	0	0	4/5
Мыши-самцы	40000	5	3	1	1	0	0	0	0	0	0	5/5
Миши-самки		5	3	1	0	1	0	0	0	0	0	5/5

Таблица 14.2 - Результаты исследования острой токсичности после однократного внутрибрюшинного введения препарата СилимаринКС белым неллинейным мышам

Вид, пол	Доза препарата (мг/кг)	Число мышей в опыте	Число погибших мышей после однократного введения препаратов в различных дозах через (сутки)								Итоговый результат	
			1	2	3	4	5	6	7	14		
Мыши-самцы	10000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	20000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	30000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	40000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Таблица 14.3 - Результаты исследования острой токсичности после однократного внутрибрюшинного введения препарата СилимаринКЗ белым неллинейным мышам

Вид, пол	Доза препарата (мг/кг)	Число мышей в опыте	Число погибших мышей после однократного введения препаратов в различных дозах через (сутки)								Итоговый результат	
			1	2	3	4	5	6	7	14		
Мыши-самцы	10000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	20000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	30000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	40000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Мыши-самцы	Контроль	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5
Миши-самки	Контроль	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/5

Введение препаратов «СилимаринМ» и «СилимаринКЗ» белым нелинейным мышам внутрижелудочно в дозе 10000 мг/кг не привел к статистически значимому изменению динамики привесов, в то время как введение в той же дозе препарата «СилимаринКС» способствовало достоверному увеличению среднесуточного прироста массы тела на 18 % относительно контрольных животных.

Вместе с этим, при введении препаратов в диапазоне доз 20000 и 30000 мг/кг массы тела привело к статистически значимому снижению динамики привесов только в группе мышей которым вводили водно-дисперсионный раствор силимарина.

Так для препарата «СилимаринМ» отмечается отрицательный среднесуточный привес за 14 дней который составил соответственно $98,12 \pm 1,35^*$ и $97,39 \pm 3,07^* \%$ против контрольного значения $112,1 \pm 5,6 \%$.

В то время как однократное внутрибрюшинное введение препаратов «СилимаринКС» и «СилимаринКЗ», белым нелинейным мышам в дозах 20000 и 30000 мг/кг массы тела, составило соответственно для первого препарата $110 \pm 0,32$ и $109,0 \pm 7,1\%$, для второго - $116,7 \pm 0,26$ и $108,15 \pm 3,23\%$ против контрольного значения $112,1 \pm 5,6 \%$.

Данный факт указывает, что все вводимые дозы препарата «СилимаринМ» оказывают общетоксическое действие на организм животных. Вместе с этим отмечается дозозависимый эффект общетоксического действия данного препарата на организм белых нелинейных мышей. Который проявляется в интенсивности снижения динамики среднесуточных привесов в зависимости от дозы препарата. Чем выше доза, тем интенсивнее снижение привесов.

Вместе с этим при введении препаратов силимарина на основе коллоидных частиц в дозе 40000 мг/кг по лекарственной форме хотя и не вызывает гибели животных, все же приводит к достоверному снижению динамики привесов так для препарата «СилимаринКС» среднесуточный привес составил $101,54 \pm 3,08\%$, для «СилимаринКЗ» - $99,26 \pm 0,89\%$, против контрольного значения $112,1 \pm 5,6 \%$.

Наряду с этим особое внимание необходимо обратить на показатели коэффициентов внутренних органов белых нелинейных мышей на 14 сутки после однократного внутрижелудочного введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц (таблица 16).

Анализируя результаты взвешивания внутренних органов животных после однократного внутрижелудочного введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц белым нелинейным мышам можно заключить, что данные лекарственные средства не оказывают отрицательного влияния на весовые коэффициенты внутренних органов животных. Массовые коэффициенты печени, почек, селезёнки и сердца опытных групп мышей не отличаются от контрольных животных.

Таблица 15 - Динамика прироста массы тела белых нелинейных мышей при однократном внутрижелудочном введении в остром опыте (n = 10; P ≤ 0,05)

Доза, мг/кг	Масса (г) после введения через (суток)				Прирост за 14 дней	% к исходной массе тела
	0	1	7	14		
Водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ)						
10000	18,97±0,42	19±0,44	19,7±0,5	20,53±0,7	1,56±0,4	108,19±2,3
20000	19,1±0,44	18,97±0,36	18,56±0,22	18,41±0,23	-0,36±0,26*	98,12±1,35*
30000	19,23±0,75	18,92±0,66	18,68±0,58	18,51±0,75	-0,5±0,59*	97,39±3,07*
40000	19,1±0,65					
Силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС)						
10000	19,21±0,83	19,91±0,34	22,06±0,41	23,93±0,28	4,02±0,01	120,2±0,29
20000	19,89	20,41±0,41	22,41±0,28	22,5±0,36	2,09±0,02	110±0,32
30000	19,1±0,44	21,3±0,3	22,0±0,9	23,2±1,6	1,9±1,5	109,0±7,1
40000	19,03±0,69	18,96±0,67	19,03±0,81	19,2±1,03	0,3±0,6*	101,54±3,08*
Силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ)						
10000	19,84±0,88	20,3±0,6	22,0±0,9	23,8±1,1	3,6±1	117,6±5,1
20000	19,78±0,79	20,64±0,56	22,02±0,32	24,09±0,23	3,45±0,01	116,7±0,26
30000	18,75±0,5	19±0,6	19,48±0,6	19,88±0,67	1,5±0,59*	108,15±3,23
40000	19,57±0,78	19,21±0,56	19,18±0,56	19,15±0,61	-0,14±0,17*	99,26±0,89*
Контроль	19,97±0,4	21,3±0,3	22,0±0,9	23,8±1,1	2,6±1,2	112,1±5,6
* Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами (P ≤ 0,05 при t критическом 2,10)						

Таблица 16 - Масса органов мышей и их коэффициенты в зависимости от дозы на 14 день после однократного внутрижелудочного введения препаратов

Доза, мг/кг	Вес мыши	Печень		Почки		Селезенка		Сердце	
		масса	коэффициент	масса	коэффициент	масса	коэффициент	масса	коэффициент
Водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ)									
10000	20,53±0,7	1,15±0,1014	0,05±0,0057	0,31±0,0339	0,02±0,0014	0,33±0,1029	0,02±0,0048	0,13±0,0214	0,01±0,001
20000	18,41±0,23	0,97±0,1116	0,05±0,0065	0,26±0,0284	0,01±0,0015	0,31±0,1311	0,02±0,0069	0,26±0,2559	0,01±0,0007
30000	18,51±0,75	1,05±0,0954	0,06±0,0047	0,25±0,0316	0,01±0,0016	0,3±0,0649	0,02±0,0037	0,12±0,0205	0,01±0,001
40000									
Силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС)									
10000	23,93±0,28	1,28±0,08	0,0535±0,0034	0,32±0,0031	0,0134±0,0012	0,16±0,09	0,0067±0,0076	0,12±0,035	0,005±0,0009
20000	22,5±0,36	1,24±0,09	0,0551±0,0046	0,29±0,0029	0,0129±0,0017	0,16±0,087	0,0071±0,0069	0,11±0,038	0,0049±0,001
30000	23,2±1,6	1,37±0,073	0,0551±0,01	0,30±0,023	0,0129±0,0011	0,11±0,0166	0,0045±0,0008	0,12±0,005	0,0053±0,0003
40000	19,2±1,03	1,01±0,0694	0,05±0,0043	0,26±0,026	0,01±0,0014	0,28±0,0406	0,01±0,0021	0,12±0,0149	0,01±0,0009
Силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ)									
10000	23,8±1,1	1,383±0,14	0,05±0,008	0,29±0,02	0,012±0,001	0,11±0,02	0,0045±0,0008	0,136±0,015	0,0057±0,0006
20000	24,09±0,23	1,3±0,09	0,054±0,007	0,33±0,003	0,0137±0,005	0,17±0,003	0,0071±0,0009	0,11±0,011	0,0046±0,0007
30000	19,88±0,67	0,96±0,2168	0,05±0,0042	0,37±0,1554	0,02±0,0022	0,31±0,0796	0,02±0,004	0,12±0,016	0,01±0,0008
40000	19,15±0,61	1,11±0,1264	0,06±0,0073	0,27±0,0464	0,01±0,0021	0,3±0,1706	0,02±0,0082	0,12±0,0305	0,01±0,0017
Контроль	23,8±0,8	1,273±0,09	0,05±0,0043	0,26±0,0162	0,01±0,0007	0,098±0,0204	0,004±0,0009	0,12±0,0172	0,0048±0,0008

Анализируя полученные данные, при внутрижелудочном введении белым нелинейным мышам, как самцам, так и самкам препарата «СилимаринМ», можно констатировать следующее - дозу 10000 мг/кг следует рассматривать в качестве переносимой, дозы в диапазоне 20000 - 30000 мг/кг - в качестве летальных. Причем доза 40000 мг/кг по лекарственной форме является абсолютно летальной (приводит к гибели 100% животных).

Вместе с этим, однократное внутрижелудочное введение препаратов «СилимаринКС» и СилимаринКЗ» в максимально допустимых объемах, ни привело к гибели животных.

Расчетные токсикологические параметры для белых нелинейных мышей приводятся в таблице 17.

Таблица 17 - Параметры острого токсического действия препаратов силимарина при внутрибрюшинном введении Пробит-анализ - Метод Финни (Логнормальный закон распределения)

Препарат	LD ₁₆ (мг/кг)	LD ₅₀ (мг/кг)	LD ₈₄ (мг/кг)
«СилимаринМ»	8610± 7012	16879± 5956	33086± 7308
«СилимаринКС»		>40000	
«СилимаринКЗ»		>40000	

При внутрижелудочном введении белым нелинейным мышам среднесмертельная доза для мицелярного раствора силимарина составила 16879± 5956 мг/кг

Для препаратов на основе коллоидных частиц селена и золота среднесмертельную дозу также установить не удалось, так как максимально возможные дозы для орального введения не привели к гибели ни одного животного.

Согласно общепринятой гигиенической классификации ГОСТ 12.1.007-76, все препараты относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

Анализ полученных данных, при парентеральном (внутрибрюшинном) введении белым нелинейным мышам, как самцам, так и самкам препарата «СилимаринМ», показал, что, как и при внутрижелудочном введении дозу 10000

мг/кг следует рассматривать в качестве переносимой, дозы в диапазоне 20000 - 30000 мг/кг - в качестве летальных. Причем доза 40000 мг/кг по лекарственной форме является абсолютно летальной (приводит к гибели 100% животных).

Вместе с этим, однократное внутрибрюшинное введение препаратов «СилимаринКС» и СилимаринКЗ» в максимально допустимых объемах, ни привело к гибели животных.

Расчетные токсикологические параметры для белых нелинейных мышей приводятся в таблице 18.

Таблица 18 -Параметры острого токсического действия препаратов силимарина при внутрибрюшинном введении Пробит-анализ - Метод Финни (Логнормальный закон распределения)

Препарат	LD ₁₆ (мг/кг)	LD ₅₀ (мг/кг)	LD ₈₄ (мг/кг)
«СилимаринМ»	11005± 4971	16468± 4012	24645± 3255
«СилимаринКС»		>40000	
«СилимаринКЗ»		>40000	

В результате проведенных исследований установлено, что LD₅₀ при парентеральном введении белым нелинейным мышам, как самцам, так и самкам составляет:

Для мицелярного раствора силимарин 16468± 4012 мг/кг

Для препаратов на основе коллоидных частиц селена и золота среднесмертельную дозу установить также не удалось, так как максимально возможные дозы для парентерального введения не привели к гибели ни одного животного.

Оценка хронической токсичности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц

Целью данного исследования явилось оценить общетоксические эффекты препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц при их парентеральном (внутрибрюшинном) введении самцам крыс в течение 14 дней и при последующей 30-дневной отмене введения.

Объектом исследования служили разработанные нами препараты:

- водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ);
- силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС);
- силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ).

Настоящее исследование является доклиническим изучением безопасности оригинального лекарственного средства. Данные исследования позволяют получить достоверные сведения, характеризующие повреждающее действие фармакологического вещества при его длительном введении, выявить наиболее чувствительные органы и системы организма, а также возможность обратимости вызываемых повреждений.

Дизайн и организация исследования направлены на решение поставленной цели и базируются на общих принципах организации исследований по оценке хронической токсичности лекарственных препаратов на лабораторных животных (таблица 19).

Подбор животных в группы проводили произвольно методом «случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10%. Животных взвешивали на весах PA2102C (OHAUS).

Каждая опытная группа крыс массой 200-230 г состояла из 15 животных.

Масса животных указана на время первого введения препарата.

Таблица 19 - Дизайн опыта по хронической токсичности

Группа	Вид, пол животных	Кол-во животных в группе	Препарат (вариант опыта)	Дозы, кол-во	Объем раствора для введения, мл/животное	Режим введения
1	крысы-самцы массой 200-230 г	15	«СилимаринМ» (испытуемый препарат)	суточная доза, рекомендуемая для клинических испытаний (100 мг/кг)	0,5 - 1	внутримышечно, 1 раз в день, 14 дней
2	крысы-самцы массой 200-230 г	15	«СилимаринМ» (испытуемый препарат)	5 кратная предполагаемая суточная доза, рекомендуемая для клинических испытаний (500 мг/кг по д.в.)	0,5 - 1	внутримышечно, 1 раз в день, 14 дней
3	крысы-самцы массой 200-230 г	15	«СилимаринКС» (испытуемый препарат)	суточная доза, рекомендуемая для клинических испытаний (100 мг/кг)	0,5 - 1	внутримышечно, 1 раз в день, 14 дней
4	крысы-самцы массой 200-230 г	15	«СилимаринКС» (испытуемый препарат)	5 кратная предполагаемая суточная доза, рекомендуемая для клинических испытаний (500 мг/кг по д.в.)	0,5 - 1	внутримышечно, 1 раз в день, 14 дней
5	крысы-самцы массой 200-230 г	15	«СилимаринКЗ» (испытуемый препарат)	суточная доза, рекомендуемая для клинических испытаний (100 мг/кг)	0,5 - 1	внутримышечно, 1 раз в день, 14 дней
6	крысы-самцы массой 200-230 г	15	«СилимаринКЗ» (испытуемый препарат)	5 кратная предполагаемая суточная доза, рекомендуемая для клинических испытаний (500 мг/кг по д.в.)	0,5 - 1	внутримышечно, 1 раз в день, 14 дней
7	крысы-самцы массой 200-230 г	15	0,9% раствор натрия хлорида (контроль)		1	внутримышечно, 1 раз в день, 14 дней

Каждое животное имело отчетливо детектируемую метку (раствором пикриновой кислоты); на этикетке на клетке указано название опыта, его

продолжительность, номер группы, количество животных, ответственное лицо и т.д.

Подготовку к опыту крыс проводили в соответствии с указаниями ОФС «Аномальная токсичность» ГФ XII. Перед опытом у животных отбирали корм и воду. Через два часа животных взвешивали и распределяли по группам.

В качестве контрольного вещества использовали 0,9% раствор натрия хлорида ОАО «Биохимик», г. Саранск, ул. Васенко 15А, серия 1740415, дата производства 01.2016.

Препараты применялись в нативном виде.

Процедура введения препаратов

При оценке парентеральной токсичности испытуемые препараты вводили крысам внутримышечно с помощью одноразовых шприцев для инъекций. При выборе доз мы руководствовались результатами, полученными при исследовании острой токсичности препаратов, а также предполагаемыми максимальными суточными дозами, в которых фармакологическое вещество будет рекомендовано для клинического изучения.

Дозу для лабораторных крыс рассчитывали согласно предполагаемым максимальным суточным дозам, в которых препараты будут рекомендованы для клинического изучения.

Препараты вводили в дозах по лекарственной форме, при этом учитывали объем вводимого раствора, который не должен превышать для крысы массой 200 – 230 г – 5 мл.

Для проведения эксперимента было сформировано по принципу аналогов 7 групп крыс – самцов, массой 200-230 г, по 15 голов в каждой. Животным 1 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 14 дней вводили препарат «СилимаринМ» в дозе 100 мг/кг по лекарственной форме, что соответствовало однократной предполагаемой максимальной дозе, которая будет рекомендована для клинических испытаний; 2-ой группе — 5 мг/кг по лекарственной форме, что соответствовало 5 кратной предполагаемой максимальной дозе, которая будет рекомендована для клинических испытаний. Крысам третьей группы вводили

препарат «СилимаринКС» в дозе 100 мг/кг, четвертой – 500 мг/кг данного препарата, пятой опытной группе назначали внутримышечно «СилимаринКЗ» в дозе 100 мг/кг, шестой – 500 мг/кг. Животным седьмой (контрольной) группы, при тех же условиях содержания и кормления, вводили равный объем физиологического раствора (смотри выше «Контрольное вещество») из расчета максимального объема вводимого вещества, что соответствует 2, 4 и 6 группам животных. Препараты вводили внутримышечно 1 раз в день, в течение 14 дней.

В течение эксперимента животных еженедельно взвешивали, учитывали клиническое состояние, выживаемость, активность, потребление корма и воды. Через 14 дней введение препарата прекращали, 5 животных из каждой группы подвергали эвтаназии под эфирным наркозом и определяли у них коэффициенты массы внутренних органов. У остальных животных отбирали кровь, получали сыворотку, которые исследовали по ряду показателей. Взятие крови производили из сердца, с применением средств для наркоза. Исследование крови и сыворотки повторяли через 21 и 30 дней после окончания введения препарата. По окончании эксперимента оставшихся животных подвергали эвтаназии методом транслокации шейных позвонков с использованием средств для наркоза. Влияние препарата на интегральные показатели оценивали по изменению коэффициентов массы внутренних органов (печень, почки, селезенка, сердце).

На протяжении подострого и хронического экспериментов животных обследовали, используя интегральные и специфические показатели.

В качестве интегральных показателей были взяты - внешний вид, поведение, симптомы интоксикации, определение массы тела, оценка периферической крови, весовые коэффициенты внутренних органов. Специфическими можно считать оценку функционального состояния печени и почек.

Для регистрации поведенческих реакций использовались некоторые показатели динамической и статической работоспособности животных методом «Открытое поле».

«Открытое поле» представляло собой камеру 1 м в длину и 1 м в ширину, с высотой стенок 0,5 м, из белого пластика, дно которой было расчерчено на 25 равных квадратов. Освещение производилось лампой мощностью 100 Вт, подвешенной на высоте 1,5 м от дна камеры. Перед проведением теста животных держали в течение 1 минуты в затемненной картонной камере размером 300×150×100 мм с отверстиями для доступа воздуха. Длительность нахождения животного в камере была равна 3 минутам. Крыс помещали в центр «Открытого поля» и засекали время выхода из центрального квадрата – показатель горизонтальной двигательной активности, число вертикальных стоек на задние лапы за 3 минуты - показатель вертикальной двигательной активности. Имеются данные о высокой чувствительности данной реакции для крыс. Указанный метод может служить объективным показателем общего состояния животных. Сезонные колебания показателя незначительны ($5,59 \pm 0,61$).

Для оценки статической мышечной работоспособности применяли метод удерживания животных на горизонтальном стержне. Учитывалось длительность пребывания животного на стержне. Этот метод является наиболее простым и доступным для токсикологических исследований. Он не требует дорогостоящих приборов, и длительность его выполнения может быть учтена с достаточной точностью.

Исследование морфологического состава периферической крови проводили на гематологическом анализаторе MicroCC 20plus (США). Для изучения системного действия препаратов, проводили определение основных показателей метаболизма в сыворотке крови животных, которые включали определение общего белка сыворотки крови и креатинина, глюкозы, активность основных ферментов, имеющих диагностическое значение при нарушении функциональной активности основного органа метаболизма, печени - аспартат – и аланинаминотрансферазы, щелочная фосфатаза, билирубин. Функциональное состояние почек оценивали, используя комплекс методов: определение рН и относительной плотности мочи, определение уровня мочевины и креатинина в сыворотке крови.

Основным составляющим компонентом настоящих исследований было характеристика повреждающего действия фармакологического вещества при его длительном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, а также исследование возможности обратимости вызываемых повреждений.

В течение всего опыта регулярно проводили клинический осмотр крыс в клетке (ежедневно), в руках и на открытой площадке (на 1; 14, 35 и 44 сутки после начала эксперимента).

На протяжении всего эксперимента животные всех групп были активны, хорошо принимали корм, равномерно увеличивали массу тела. Во 2 группе у животных через 12 дней после введения препарата отмечалась незначительная гиподинамия, угнетение, незначительное снижение потребления корма.

Клинический анализ периферической крови показал (Таблица 20.1-20.3), что введение препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в терапевтических и 5 кратных предполагаемых максимальных терапевтических дозах, которая будет рекомендована для клинических испытаний (100 и 500 мг/кг по лекарственной форме) не приводит к достоверному изменению гематологических показателей крови. Данные показатели не отличаются от значений контрольной группы животных на всем протяжении опыта.

Таблица 20.1 - Гематологические показатели крови крыс самцов после курсового парентерального (внутримышечного) введения препаратов в субхроническом эксперименте через 14 суток после начала опыта

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа	7 группа (контрольная)
1.	WBC	$\times 10^9/L$	$7,01 \pm 0,33$	$7,01 \pm 0,64$	$7,06 \pm 0,24$	$6,94 \pm 0,45$	$6,67 \pm 0,63$	$6,55 \pm 0,66$	$6,36 \pm 0,49$
2.	LYM	$\times 10^9/L$	$4,24 \pm 0,67$	$4,21 \pm 0,72$	$3,98 \pm 0,68$	$3,78 \pm 0,70$	$4,16 \pm 0,74$	$4,35 \pm 0,45$	$4,18 \pm 0,74$
3.	MID	$\times 10^9/L$	$1,29 \pm 0,13$	$1,17 \pm 0,18$	$1,29 \pm 0,15$	$1,09 \pm 0,21$	$1,19 \pm 0,12$	$1,35 \pm 0,12$	$1,15 \pm 0,19$
4.	GRA	$\times 10^9/L$	$1,47 \pm 0,75$	$1,63 \pm 1,01$	$1,79 \pm 0,81$	$2,08 \pm 0,58$	$1,32 \pm 1,24$	$0,85 \pm 0,77$	$1,03 \pm 0,70$
5.	LYM	%	$60,69 \pm 10,34$	$60,50 \pm 13,32$	$56,45 \pm 10,54$	$54,36 \pm 8,24$	$62,93 \pm 14,76$	$66,75 \pm 8,39$	$65,85 \pm 11,93$
6.	MID	%	$18,45 \pm 2,19$	$16,68 \pm 1,91$	$18,35 \pm 2,51$	$15,62 \pm 2,62$	$17,92 \pm 3,01$	$20,74 \pm 3,66$	$18,18 \pm 3,30$
7.	GRA	%	$20,87 \pm 10,06$	$22,82 \pm 12,87$	$25,20 \pm 10,87$	$30,02 \pm 8,43$	$19,15 \pm 17,46$	$12,50 \pm 10,56$	$15,97 \pm 10,92$
8.	RBC	$\times 10^{12}/L$	$7,48 \pm 0,49$	$7,19 \pm 0,65$	$7,35 \pm 0,19$	$7,09 \pm 0,60$	$7,29 \pm 0,37$	$7,40 \pm 0,81$	$7,06 \pm 0,25$
9.	HGB	g/L	$108,07 \pm 12,6$	$109,43 \pm 8,24$	$111,48 \pm 11$	$113,13 \pm 1,09$	$105,46 \pm 7,19$	$109,31 \pm 5,56$	$106,72 \pm 11,3$
10.	MCHC	g/L	$328,97 \pm 48,63$	$314,70 \pm 45,54$	$325,73 \pm 37,4$	$317,39 \pm 33,71$	$317,63 \pm 39,92$	$333,81 \pm 19,98$	$307,81 \pm 54,86$
11.	MCH	Pg	$14,52 \pm 2,40$	$15,25 \pm 0,98$	$15,18 \pm 1,68$	$16,04 \pm 2,27$	$14,47 \pm 0,67$	$14,90 \pm 2,23$	$15,12 \pm 1,44$
12.	MCV	fl	$44,15 \pm 3,81$	$48,84 \pm 5,97$	$46,70 \pm 4,37$	$50,65 \pm 6,86$	$45,85 \pm 4,91$	$44,82 \pm 8,35$	$49,48 \pm 4,21$
13.	RDW-CV	%	$14,15 \pm 0,73$	$14,34 \pm 0,71$	$13,82 \pm 0,37$	$14,40 \pm 0,73$	$13,99 \pm 0,67$	$14,57 \pm 0,74$	$14,33 \pm 0,84$
14.	RDW-SD	fl	$32,97 \pm 2,07$	$33,14 \pm 2,31$	$34,90 \pm 2,39$	$35,27 \pm 2,47$	$34,70 \pm 2,87$	$34,79 \pm 3,04$	$35,84 \pm 3,27$
15.	HCT	%	$32,94 \pm 1,90$	$35,03 \pm 3,93$	$34,32 \pm 3,01$	$35,70 \pm 2,26$	$33,40 \pm 3,60$	$32,81 \pm 2,64$	$34,91 \pm 2,86$
16.	PLT	$\times 10^9/L$	$707,05 \pm 92,51$	$748,58 \pm 92,24$	$654,24 \pm 86$	$629,14 \pm 94,49$	$611,40 \pm 67,07$	$697,10 \pm 86,55$	$731,80 \pm 11,81$
17.	MPV	fl	$6,26 \pm 0,33$	$6,13 \pm 0,08$	$6,18 \pm 0,35$	$6,25 \pm 0,37$	$6,03 \pm 0,36$	$6,03 \pm 0,26$	$6,07 \pm 0,30$
18.	PDW	fl	$4,38 \pm 0,05$	$4,32 \pm 0,12$	$4,43 \pm 0,11$	$4,31 \pm 0,11$	$4,41 \pm 0,10$	$4,40 \pm 0,09$	$4,34 \pm 0,13$
19.	PCT	%	$0,39 \pm 0,12$	$0,47 \pm 0,12$	$0,35 \pm 0,17$	$0,31 \pm 0,07$	$0,38 \pm 0,16$	$0,46 \pm 0,11$	$0,36 \pm 0,23$
20.	P-LCR	%	$6,26 \pm 0,86$	$5,64 \pm 0,45$	$6,55 \pm 1,01$	$6,30 \pm 1,04$	$6,56 \pm 0,32$	$6,25 \pm 1,17$	$6,46 \pm 0,84$

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

Таблица 20.2 - Гематологические показатели крови крыс самцов после курсового парентерального (внутримышечного) введения препаратов в субхроническом эксперименте через 35 суток после начала опыта

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа	7 группа (контрольная)
1.	WBC	$\times 10^9/L$	$6,91 \pm 0,32$	$6,71 \pm 0,64$	$7,9 \pm 5,33$	$7,4 \pm 4,37$	$7,9 \pm 2,35$	$7,9 \pm 4,38$	$7,1 \pm 2,02$
2.	LYM	$\times 10^9/L$	$4,01 \pm 0,96$	$3,38 \pm 0,52$	$6 \pm 4,14$	$5,6 \pm 3,48$	$5,5 \pm 1,4$	$4,9 \pm 3,14$	$3,7 \pm 1,13$
3.	MID	$\times 10^9/L$	$1,22 \pm 0,18$	$1,24 \pm 0,13$	$1,2 \pm 0,91$	$1,2 \pm 0,87$	$1,4 \pm 0,64$	$1,7 \pm 0,84$	$1,3 \pm 0,33$
4.	GRA	$\times 10^9/L$	$1,68 \pm 1,01$	$2,09 \pm 0,55$	$0,6 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,39$	$1 \pm 0,62$	$1,4 \pm 0,54$	$2,1 \pm 0,94$
5.	LYM	%	$58,10 \pm 14,76$	$50,50 \pm 7,13$	$75,5 \pm 1,93$	$75,4 \pm 10,73$	$70,1 \pm 9,26$	$58,9 \pm 11,24$	$52,5 \pm 7,81$
6.	MID	%	$17,68 \pm 2,03$	$18,51 \pm 1,81$	$15,2 \pm 1,78$	$15,7 \pm 4,99$	$17,2 \pm 4,1$	$21,5 \pm 3,55$	$17,9 \pm 2,11$
7.	GRA	%	$24,21 \pm 14,16$	$30,99 \pm 6,22$	$9,3 \pm 2,97$	$8,9 \pm 6,33$	$12,8 \pm 6,32$	$19,5 \pm 8,04$	$29,7 \pm 8,21$
8.	RBC	$\times 10^{12}/L$	$7,51 \pm 0,43$	$7,23 \pm 0,72$	$6,6 \pm 1,07$	$6,4 \pm 1,15$	$9,2 \pm 3,22$	$7,7 \pm 0,95$	$7,2 \pm 0,73$
9.	HGB	g/L	$113,22 \pm 9,69$	$104,94 \pm 7,14$	$88,2 \pm 15,71$	$85,6 \pm 14,67$	$130,4 \pm 51,7$	$117,6 \pm 13,83$	$101,2 \pm 11,71$
10.	MCHC	g/L	$326,42 \pm 28,53$	$297,53 \pm 26,57$	$297 \pm 14,09$	$297 \pm 19,5$	$317,8 \pm 20,9$	$299,4 \pm 13,03$	$298,4 \pm 7,69$
11.	MCH	Pg	$15,12 \pm 1,81$	$14,55 \pm 0,89$	$13,4 \pm 0,75$	$13,4 \pm 0,5$	$14,1 \pm 0,65$	$15,3 \pm 0,61$	$14,1 \pm 0,8$
12.	MCV	fl	$46,41 \pm 5,70$	$49,16 \pm 6,13$	$45,3 \pm 3,92$	$45,1 \pm 2,13$	$44,4 \pm 1,76$	$51,2 \pm 2,42$	$47,2 \pm 1,81$
13.	RDW-CV	%	$14,19 \pm 0,68$	$14,17 \pm 0,62$	$15,8 \pm 2,07$	$14,9 \pm 1,15$	$14,6 \pm 1,71$	$14,4 \pm 1,21$	$14 \pm 0,57$
14.	RDW-SD	fl	$34,00 \pm 2,07$	$33,61 \pm 3,02$	$35,8 \pm 5,03$	$33,7 \pm 2,32$	$32,4 \pm 3,4$	$37 \pm 4,67$	$32,9 \pm 1,66$
15.	HCT	%	$34,79 \pm 3,67$	$35,32 \pm 1,78$	$29,8 \pm 6,53$	$29 \pm 5,73$	$40,6 \pm 13,68$	$39,3 \pm 4,48$	$33,9 \pm 3,28$
16.	PLT	$\times 10^9/L$	$711,15 \pm 82,42$	$672,32 \pm 141,43$	$695,2 \pm 116$	$651,4 \pm 127$	862 ± 181	$588,4 \pm 547$	$519,2 \pm 334$
17.	MPV	fl	$6,09 \pm 0,31$	$6,31 \pm 0,28$	$6,6 \pm 0,4$	$7,9 \pm 3,52$	$6,6 \pm 0,27$	$6,3 \pm 0,43$	$6,2 \pm 0,43$
18.	PDW	fl	$4,29 \pm 0,11$	$4,34 \pm 0,12$	$5,8 \pm 0,99$	$9,1 \pm 7,07$	$6,5 \pm 0,64$	$4,6 \pm 0,85$	$4,8 \pm 0,34$
19.	PCT	%	$0,38 \pm 0,17$	$0,43 \pm 0,17$	$0,5 \pm 0,09$	$0,5 \pm 0,33$	$0,6 \pm 0,14$	$0,4 \pm 0,36$	$0,3 \pm 0,2$
20.	P-LCR	%	$6,31 \pm 0,31$	$6,49 \pm 1,16$	$10,6 \pm 3,76$	$19,2 \pm 24,13$	$10,3 \pm 3,01$	$6,8 \pm 3,25$	$7 \pm 2,4$

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

Таблица 20.3 - Гематологические показатели крови крыс самцов после курсового парентерального (внутримышечного) введения препаратов в субхроническом эксперименте через 44 дня после начала опыта

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа	7 группа (контрольная)
1.	WBC	$\times 10^9/L$	7,3 \pm 2,88	8,5 \pm 2,98	7,1 \pm 3,56	7,7 \pm 3,81	6,7 \pm 3,27	7,5 \pm 1,93	6,9 \pm 2,57
2.	LYM	$\times 10^9/L$	4,7 \pm 2,19	5,7 \pm 1,46	5 \pm 2,35	5,9 \pm 2,74	4,4 \pm 2,31	4,4 \pm 2,03	4,3 \pm 1,98
3.	MID	$\times 10^9/L$	1,4 \pm 0,48	1,7 \pm 1,19	1,4 \pm 0,79	1,1 \pm 0,77	1,2 \pm 0,62	1,4 \pm 0,41	1,4 \pm 0,55
4.	GRA	$\times 10^9/L$	1,1 \pm 0,43	1,1 \pm 0,82	0,8 \pm 0,52	0,7 \pm 0,65	1,2 \pm 0,82	1,7 \pm 0,93	1,1 \pm 0,79
5.	LYM	%	64,6 \pm 7,11	67,9 \pm 9,34	69,9 \pm 6,22	77,6 \pm 9,57	64,9 \pm 10,27	57,3 \pm 13,87	62,7 \pm 13,1
6.	MID	%	19,3 \pm 2,72	19,1 \pm 6,44	19,2 \pm 3,06	14,4 \pm 4,62	18 \pm 1,51	18,8 \pm 1,16	20,2 \pm 3,57
7.	GRA	%	16,1 \pm 6,24	13 \pm 8	10,9 \pm 3,57	8 \pm 5,09	17 \pm 10,64	23,9 \pm 14,23	17,1 \pm 11,62
8.	RBC	$\times 10^{12}/L$	8,3 \pm 2,7	7,2 \pm 0,44	7,2 \pm 0,47	6,8 \pm 0,74	7,3 \pm 0,61	8,1 \pm 2,84	7,4 \pm 0,59
9.	HGB	g/L	115,4 \pm 43,06	95,4 \pm 8,46	98,6 \pm 7,12	95 \pm 13,53	100 \pm 8,08	117 \pm 42,14	101,9 \pm 7,59
10.	MCHC	g/L	312,6 \pm 24,78	295,2 \pm 12,87	295,8 \pm 10,3	310,2 \pm 15,6	292,7 \pm 15,11	304,5 \pm 27,35	308,8 \pm 22,57
11.	MCH	Pg	13,8 \pm 0,69	13,3 \pm 0,43	13,6 \pm 0,54	13,9 \pm 0,61	13,6 \pm 0,82	14,5 \pm 0,87	13,8 \pm 0,48
12.	MCV	fl	44,4 \pm 2,13	45 \pm 1,61	46 \pm 0,69	44,8 \pm 2,58	46,6 \pm 3,74	48 \pm 6,21	44,9 \pm 1,92
13.	RDW-CV	%	14,5 \pm 1,43	14,8 \pm 1,67	14,3 \pm 1,56	14,5 \pm 0,34	14 \pm 1,55	14,3 \pm 0,83	14,7 \pm 1,16
14.	RDW-SD	fl	32,1 \pm 1,94	33,3 \pm 3,54	32,9 \pm 4	32,5 \pm 2,31	31,9 \pm 2,5	33,5 \pm 3,11	33,2 \pm 3,57
15.	HCT	%	36,8 \pm 11,88	32,3 \pm 2,01	33,3 \pm 2,15	30,7 \pm 4,9	34,2 \pm 3	38,2 \pm 10,69	33,1 \pm 3,1
16.	PLT	$\times 10^9/L$	615,2 \pm 401	630,8 \pm 213	545 \pm 168	663,4 \pm 240	577,7 \pm 317,07	681,6 \pm 304,03	573,2 \pm 135,05
17.	MPV	fl	7 \pm 1,49	7,3 \pm 3,07	6,6 \pm 0,31	6,5 \pm 0,42	6,9 \pm 1,56	6,4 \pm 0,41	6,6 \pm 0,27
18.	PDW	fl	5,2 \pm 1,2	5 \pm 0,46	4,9 \pm 0,38	6,4 \pm 0,55	4,5 \pm 0,3	5 \pm 1,31	4,9 \pm 0,55
19.	PCT	%	0,4 \pm 0,34	0,5 \pm 0,41	0,4 \pm 0,12	0,4 \pm 0,17	0,4 \pm 0,31	0,5 \pm 0,23	0,4 \pm 0,09
20.	P-LCR	%	13,6 \pm 11,57	15,4 \pm 21,58	10,9 \pm 2,53	8,6 \pm 4,49	11,6 \pm 12,55	9,4 \pm 4,33	10,1 \pm 3,21

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

Таким образом доказано, что субхроническое введение препаратов «СилимаринМ», «СилимаринКС» и «СилимаринКЗ» крысам в терапевтической и пятикратной терапевтической дозе не оказывает отрицательного влияния на костномозговое кроветворение. Кроме того, внутримышечное введение данных препаратов не вызывает ответной реакции со стороны лейкограммы периферической крови.

При исследовании влияния препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на основные показатели метаболизма в хроническом эксперименте учитывали концентрацию общего белка и его фракций, мочевины, креатинина, глюкозы, активность аланин - и аспаргатаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, а также билирубина в сыворотке крови (таблицах 21.1-21.3).

Проведенные исследования показали, что после курсового внутримышечного введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц, 1 раз в день, 14 дней значимых отличий у подопытной и контрольной группы животных не наблюдалось.

Результаты исследования функционального состояния почек представлены в таблицах 22.1-22.3.

Из приведенных в таблице данных видно, что при длительном введении больших доз препарата отклонений физиологических значений основных показателей мочи не наблюдается.

Таблица 21.1 - Биохимические показатели крови крыс самцов после курсового парентерального (внутримышечного) введения препаратов в субхроническом опыте через 14 суток после начала эксперимента

Показатели	Ед. изм.	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа	7 группа (контрольная)
АЛТ	Е/л	70,93±8,86	59,39±1,84	61,03±3,86	61,45±4,03	60,02±4,5	63,33±2,73	58,01±2,92
АСТ	Е/л	53,34±4,92	41,97±1,94	51,55±3,07	53,44±3,29	52,53±4,04	50,93±3,03	50,65±2,57
Щелочная фосфатаза	Е/л	259,45±17,31	297,96±14,83	267,88±14,98	263,03±21,51	256,9±19,87	275,5±18,18	262,98±19,16
Мочевина	ммоль/л	6,91±0,48	8,23±0,62	6,74±0,18	6,37±0,32	6,44±0,44	6,65±0,34	6,48±0,38
Креатинин	ммоль/л	42,09±4,1	41,53±2,42	40,17±2,65	40,67±2,96	40,23±2,83	40,98±2,83	40,85±2,99
Билирубин	мкмоль/л	0,23±0,02	0,31±0,02	0,21±0,02	0,2±0,02	0,2±0,01	0,2±0,02	0,2±0,02
Белок общий	г/л	61,21±3,86	73,51±7,61	55,9±4,61	60,05±4,14	58,53±3,49	55,56±4,78	58,51±3,03
Альбумин	г/л	28,05±1,13	34,62±2,03	27,4±1,76	25,46±1,18	26,55±1,61	28,16±1,67	26,84±2,09
Глобулин	г/л	33,16±3,36	38,89±4,96	28,5±4,63	34,59±4,79	31,98±4,21	27,4±3,06	31,68±4,01
Глюкоза	ммоль/л	4,39±0,16	5,06±0,14	4±0,26	4,12±0,14	5,77±0,18	4,85±0,14	4,37±0,42

Таблица 21.2 - Биохимические показатели крови крыс самцов после курсового парентерального (внутримышечного) введения препаратов в субхроническом опыте через 35 суток после начала эксперимента

Показатели	Ед. изм.	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа	7 группа (контрольная)
АЛТ	Е/л	60,4±3,98	61,68±3,73	63,26±7,47	63,15±7,34	62,16±2,98	65,07±6,01	58,66±5,63
АСТ	Е/л	52,51±3,35	50,37±3,52	49,36±3,84	53,61±4,42	51,98±2,83	52,05±5,07	50,44±3,83
Щелочная фосфатаза	Е/л	256,98±10,33	260,67±19,55	255±23,11	268,07±19,17	260,27±23,34	275,31±12,4	241,36±12,92
Мочевина	ммоль/л	6,71±0,24	6,44±0,27	6,16±0,69	6,35±0,64	7,01±0,63	5,65±0,46	6,97±0,42
Креатинин	ммоль/л	40,17±2,5	39,47±1,81	39,2±3,71	39,4±4,21	37,69±3,7	43,8±4,34	39,3±2,75
Билирубин	мкмоль/л	0,21±0,01	0,2±0,02	0,22±0,02	0,17±0	0,21±0,02	0,21±0,01	0,21±0,02
Белок общий	г/л	58,55±4,18	59,58±5,64	66,89±5,23	69,84±6,88	67,72±6,8	67,41±6,74	69,32±7,06
Альбумин	г/л	27,89±1,47	27,7±1,78	26,84±2,76	26,02±2,97	26,25±2,82	27,4±2,86	27,05±2,79
Глобулин	г/л	30,66±3,07	31,88±3,08	40,05±5,24	43,82±5,75	41,47±5,16	40,02±5,46	42,27±6,35
Глюкоза	ммоль/л	4,31±0,36	3,95±0,48	4,08±0,38	4,07±0,23	4,12±0,41	4,4±0,28	4,37±0,38

Таблица 21.3 - Биохимические показатели крови крыс самцов после курсового парентерального (внутримышечного) введения препаратов в субхроническом опыте через 44 дня после начала эксперимента

Показатели	Ед. изм.	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа	7 группа (контрольная)
АЛТ	Е/л	67,04 ± 2,81	67,08 ± 2,99	65,71 ± 3,68	66,02 ± 2,83	65,92 ± 1,86	67,30 ± 2,33	67,36 ± 2,99
АСТ	Е/л	57,88 ± 1,71	56,16 ± 2,66	57,34 ± 1,77	56,26 ± 0,72	57,59 ± 1,70	57,90 ± 1,32	55,78 ± 1,77
Щелочная фосфатаза	Е/л	276,45 ± 2,59	286,63 ± 5,45	278,82 ± 6,18	282,35 ± 8,69	276,72 ± 7,50	285,43 ± 11,19	284,17 ± 9,19
Мочевина	ммоль/л	7,03 ± 0,55	7,09 ± 1,00	7,13 ± 0,90	7,01 ± 0,47	7,53 ± 0,61	6,55 ± 0,67	6,99 ± 0,67
Креатинин	ммоль/л	47,43 ± 6,98	48,88 ± 2,91	49,68 ± 5,91	45,60 ± 6,70	44,67 ± 4,01	47,72 ± 2,59	47,89 ± 4,36
Билирубин	мкмоль/л	0,21±0,02	0,24±0,03	0,16±0,01	0,2±0,02	0,19±0	0,22±0,02	0,21±0,02
Белок общий	г/л	67,88±5,75	64,55±6,2	61,6±6,84	64,76±7,38	69,96±6,65	62,91±4,87	65,23±4,09
Альбумин	г/л	29,69±2,65	25,08±1,62	27±2,16	28,9±2,65	27,12±2,18	28,67±2,35	27,77±0,85
Глобулин	г/л	38,19±3,26	39,47±3,28	34,6±3,91	35,13±2,98	42,84±4,01	34,24±3,11	37,29±3,18
Глюкоза	ммоль/л	4,61±0,17	4,16±0,37	4,07±0,39	4,46±0,48	4,19±0,46	4,29±0,44	4,49±0,22

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

Таблица 22.1 - Показатели функционального состояния почек под действием препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц через 14 суток после начала эксперимента

Показатели	Ед. изм.	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа	7 группа (контрольная)
Белок	г/л	0,47±0,12	0,49±0,09	0,46±0,07	0,53±0,03	0,47±0,13	0,47±0,05	0,44±0,10
Мочевина,	ммоль/л	393±20	397±30	374±14	388±36	405±28	395±26	397±21
Глюкоза,	ммоль/л	5,37±0,23	5,37±0,25	5,34±0,17	5,26±0,30	5,53±0,36	5,26±0,38	5,31±0,28
Калий,	ммоль/л	1,75±0,13	1,70±0,12	1,74±0,15	1,88±0,10	1,74±0,11	1,90±0,09	1,74±0,08
Натрий,	ммоль/л	0,69±0,06	0,65±0,05	0,66±0,05	0,69±0,04	0,65±0,06	0,70±0,04	0,65±0,05
Уробилиноген,	мкмоль/л	12,64±0,81	12,10±1,30	12,79±0,90	12,78±0,64	12,51±1,07	11,80±0,76	13,04±1,04
pH		6,20±0,22	6,11±0,12	6,12±0,20	6,13±0,18	6,23±0,20	6,16±0,23	6,25±0,22
Билирубин,	мкмоль/л	3,59±0,27	3,80±0,23	3,87±0,20	3,50±0,16	3,65±0,34	3,83±0,30	3,64±0,17
Кетоновые тела	ммоль/л	0,67±0,30	0,77±0,11	0,82±0,28	0,94±0,14	0,85±0,21	0,77±0,29	0,88±0,25

Таблица 22.2 - Показатели функционального состояния почек под действием препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц через 35 суток после начала эксперимента

Показатели	Ед. изм.	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа	7 группа (контрольная)
Белок	г/л	0,53±0,12	0,48±0,11	0,5±0,02	0,7±0,03	0,6±0,08	0,6±0,03	0,7±0,02
Мочевина,	ммоль/л	397±20	406±15	433,7±21,37	423,7±12,73	445,6±13,9	422±16,56	420,4±15,42
Глюкоза,	ммоль/л	5,35±0,25	5,26±0,28	5,7±0,25	5,4±0,25	5,5±0,31	5,4±0,41	5,5±0,26
Калий,	ммоль/л	1,85±0,11	1,72±0,15	2,3±0,09	2,2±0,11	2,4±0,11	2,2±0,09	2,2±0,09
Натрий,	ммоль/л	0,65±0,05	0,68±0,07	2,5±0,09	0,4±0,02	2,4±0,1	1,1±0,74	0,4±0,02
Уробилиноген,	мкмоль/л	12,69±0,88	12,46±1,18	10,1±0,44	15,9±0,61	12±1,31	14,3±1,41	16,4±0,85
pH		6,16±0,24	6,19±0,15	6,9±0,25	6,4±0,23	7,1±0,32	6,4±0,23	6,6±0,2
Билирубин,	мкмоль/л	3,67±0,34	3,77±0,32	4±0,16	4,5±0,23	3,8±0,18	4,5±0,47	4,5±0,23
Кетоновые тела	ммоль/л	0,67±0,28	0,76±0,26	0,7±0,02	0,7±0,07	0,9±0,06	0,8±0,09	0,8±0,03

Таблица 22.3 - Показатели функционального состояния почек под действием препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц через 44 дня после начала эксперимента

Показатели	Ед. изм.	1 группа	2 группа	3 группа	4 группа	5 группа	6 группа	7 группа (контрольная)
Белок	г/л	0,6±0,04	0,54±0,04	0,53±0,06	0,55±0,04	0,55±0,04	0,58±0,06	0,55±0,03
Мочевина,	ммоль/л	435,7±18,2	469,53±61,61	395,76±32,03	390,59±13,66	472,67±52,96	437,81±48,15	431,94±54,53
Глюкоза,	ммоль/л	5,3±0,38	5,01±0,36	6,32±0,24	5,3±0,15	6,01±0,56	5,92±0,67	5,47±0,24
Калий,	ммоль/л	2,2±0,1	2,27±0,15	2,51±0,15	2,52±0,22	2,1±0,22	2,12±0,22	2,07±0,18
Натрий,	ммоль/л	2,4±0,11	2,88±0,15	2,33±0,15	2,57±0,27	2,32±0,19	2,27±0,23	2,76±0,22
Уробилиноген,	мкмоль/л	12,1±0,46	10,06±0,53	9,13±0,66	9,6±1,02	9,83±0,94	10,5±1,05	10,18±0,85
pH		6,8±0,33	6,94±0,41	7,4±0,57	6,46±0,59	6,4±0,34	5,92±0,17	6,39±0,65
Билирубин,	мкмоль/л	3,4±0,16	3,51±0,33	3,99±0,21	3,76±0,25	2,01±0,23	2,12±0,2	2,17±0,11
Кетоновые тела	ммоль/л	0,7±0,09	0,64±0,06	0,66±0,04	0,67±0,03	0,66±0,03	0,68±0,03	0,65±0,05

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

При исследовании функциональной активности центральной нервной системы проводили оценку работоспособности животных с помощью метода удержания на горизонтальном стержне и двигательной активности (вертикальной и горизонтальной). Данные представлены в таблице 23.

Таблица 23 - Некоторые показатели состояния центральной нервной системы животных, подвергавшихся воздействию препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в субхроническом эксперименте

День (от начала эксперимента)	Группа	ВДА (число вертикальных стоек в 3 мин)	ГДА, с.	Время удержания на стержне, с
14	1	6,7±0,45	39±1,2	73±1,7
	2	6,8±0,42	42±1	67±1,8
	3	6,7±0,42	38±1,4	68±2,4
	4	6,5±0,22	42,6±1,85	77,1±2,34
	5	6,6±0,26	42,6±1,73	76,4±3,48
	6	6,4±0,24	42,9±1,97	79±3,34
	7 (Контроль)	5,9±0,15	38,5±1,36	69,2±2,1
35	1	6,7±1,11	44±3,67	77±1,76
	2	6,7±1,62	43±3,05	76±8,09
	3	5,9±0,29	40,7±1,84	71,8±2,39
	4	6,7±0,6	38±1,78	65±2,94
	5	6,7±0,69	37±1,73	75±3,42
	6	6,4±0,28	45,1±2,12	81,7±4,34
	7 (Контроль)	6,3±0,24	44,3±1,74	76,5±3,31
44	1	6,3±0,3	44,2±1,5	80,2±3,45
	2	6±0,23	39,9±1,51	71,9±2,65
	3	6±0,25	41,1±1,56	69,1±3,02
	4	6,7±1,42	42±1,04	68±4,53
	5	6,1±0,25	39,5±1,79	69,7±3,07
	6	6,7±0,59	41±1,13	71±2,9
	7 (Контроль)	6,1±0,26	38,5±2,1	67,4±3,1

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10); ВДА-вертикальная двигательная активность; ГДА-горизонтальная двигательная активность

Как следует из таблицы, все показатели, характеризующие состояние ЦНС и работоспособности животных опытных групп, достоверно не отличаются от таковых контрольных животных.

Еще одним показателем, который необходимо принимать во внимание при оценке токсического действия препарата, является динамика прироста массы тела. Результаты приведены в таблице 24.

Внутримышечное введение крысам-самцам препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц 1 раз в день в течение 14 дней не привели к статистически значимому отличию динамики прироста массы тела опытных групп животных от контрольной. Наряду с этим, отличий среднесуточного прироста массы тела животных между группами также не имело достоверной разницы.

Таблица 24 - Динамика прироста массы тела у крыс подвергавшихся воздействию препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в субхроническом эксперименте

№ Группы	Масса (г) после введения через (суток)				Привес за 30 дней	% к исходной массе тела
	0	14	35	44		
1 группа (n=15)	214,2±7,74	225,2±14,4	242,3±8,75	283,4±20,43	72,7±26,48	134,8±14,26
2 группа (n=15)	210±8,81	225,5±11,37	248±7,15	280,8±12,88	76,8±23,74	138,2±14,74
3 группа (n=15)	201,9 ± 4,91	227,2 ± 6,64	246,5 ± 4,55	290,2 ± 10	92,0 ± 11	146,5 ± 6,52
4 группа (n=15)	210,7 ± 6,97	229,4 ± 7,86	241,0 ± 9,16	295,2 ± 10,49	86,8 ± 19	142,0 ± 12
5 группа (n=15)	203,1 ± 3,61	227,2 ± 7,28	238,9 ± 10	287,4 ± 11,14	84,2 ± 13,9	141,5 ± 7,74
6 группа (n=15)	209,7±7,27	227,8±10,71	247±11,16	288±16,19	82,5±13,53	140,2±7,36
7 группа (n=15)	210,1±11,01	234,3±9,62	267,8±5,19	298,4±20,43	85,2±12,77	140,2±7,87

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при критическом 2,10)

Исследование весовых коэффициентов внутренних органов представлено в таблице 25.

Таблица 25 - Массовые коэффициенты внутренних органов крыс при парентеральном введении препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в субхроническом эксперименте

День эксперимента	Группа	Общая масса животного	Печень		Почка		Селезенка		Сердце	
			Масса	Коэффициент	Масса	Коэффициент	Масса	Коэффициент	Масса	Коэффициент
Через 14 дней после начала эксперимента	1	230,00 ± 14,1	13,77 ± 0,85	5,99 ± 0,06	1,89 ± 0,14	0,82 ± 0,03	1,37 ± 0,07	0,60 ± 0,02	0,95 ± 0,04	0,41 ± 0,02
	2	226,20 ± 14	13,57 ± 0,60	6,00 ± 0,16	1,84 ± 0,12	0,81 ± 0,02	1,35 ± 0,09	0,60 ± 0,02	0,95 ± 0,06	0,42 ± 0,03
	3	229,20 ± 16,2	13,66 ± 1,03	5,96 ± 0,21	1,90 ± 0,18	0,83 ± 0,03	1,41 ± 0,10	0,61 ± 0,01	0,95 ± 0,09	0,41 ± 0,02
	4	226,8±19,05	12±1,35	5,54±0,23	1,78±0,18	0,82±0,02	1,35±0,13	0,63±0,03	0,92±0,07	0,43±0,01
	5	236,2±15,69	11,9±0,82	5,5±0,21	1,72±0,18	0,79±0,03	1,32±0,12	0,61±0,02	0,91±0,06	0,42±0,01
	6	230,6±12,7	11,6±0,87	5,49±0,12	1,67±0,11	0,79±0,03	1,28±0,07	0,61±0,02	0,88±0,02	0,42±0,02
	7 (контрольная)	233,2±11,41	12,8±0,96	5,5±0,22	1,87±0,11	0,8±0,02	1,41±0,08	0,6±0,01	0,98±0,04	0,42±0,02
Через 35 дней после начала эксперимента	1	234,40 ± 8,27	14,01 ± 0,58	5,98 ± 0,22	1,93 ± 0,06	0,83 ± 0,04	1,40 ± 0,07	0,60 ± 0,02	0,98 ± 0,08	0,42 ± 0,02
	2	247,00 ± 8,25	14,63 ± 0,76	5,92 ± 0,22	2,02 ± 0,14	0,82 ± 0,03	1,49 ± 0,07	0,60 ± 0,02	1,06 ± 0,07	0,43 ± 0,02
	3	238,80 ± 21,2	14,32 ± 0,93	6,00 ± 0,22	1,96 ± 0,17	0,82 ± 0,03	1,43 ± 0,11	0,60 ± 0,01	0,98 ± 0,09	0,41 ± 0,01
	4	239,2±14,69	14,7±0,61	6,08±0,12	1,98±0,12	0,82±0,03	1,57±0,06	0,65±0,03	1±0,07	0,41±0,01
	5	248,8±12,2	13,6±0,82	5,48±0,22	1,93±0,08	0,78±0,01	1,54±0,13	0,62±0,03	1,02±0,05	0,41±0,01
	6	250,2±21,16	15,7±1,18	5,55±0,07	2,26±0,1	0,8±0,03	1,76±0,14	0,62±0,02	1,19±0,11	0,42±0,02
	7 (контрольная)	268,2±9,61	15,2±0,52	5,65±0,07	2,13±0,12	0,79±0,03	1,63±0,08	0,61±0,02	1,15±0,06	0,43±0,02
Через 44 дня после начала эксперимента	1	283,4±20,4	15,5±0,77	5,54±0,24	2,21±0,07	0,79±0,02	1,78±0,12	0,63±0,02	1,17±0,07	0,42±0,01
	2	280,8±12,9	15,8±0,78	5,49±0,19	2,3±0,23	0,8±0,04	1,78±0,11	0,62±0,02	1,2±0,11	0,42±0,02
	3	290,20 ± 10	17,13 ± 0,71	5,91 ± 0,18	2,37 ± 0,13	0,82 ± 0,03	1,73 ± 0,12	0,59 ± 0,02	1,22 ± 0,03	0,42 ± 0,02
	4	295,20 ± 10	17,74 ± 0,64	6,01 ± 0,21	2,43 ± 0,13	0,82 ± 0,02	1,77 ± 0,10	0,60 ± 0,02	1,28 ± 0,07	0,43 ± 0,02
	5	287,40 ± 11	17,29 ± 0,79	6,01 ± 0,12	2,38 ± 0,06	0,83 ± 0,03	1,70 ± 0,07	0,59 ± 0,01	1,23 ± 0,05	0,43 ± 0,03
	6	288±16,19	15,8±0,78	5,49±0,19	2,3±0,23	0,8±0,04	1,78±0,11	0,62±0,02	1,2±0,11	0,42±0,02
	7 (контрольная)	298,6±20,35	16±1,33	5,35±0,14	2,44±0,21	0,82±0,04	1,87±0,09	0,62±0,01	1,25±0,08	0,42±0,02

Как следует из таблицы, массовые коэффициенты органов и динамика прироста живой массы у животных опытных групп находятся на одном уровне с контролем и достоверно от него не отличаются, что свидетельствует о том, что этот показатель не является определяющим при воздействии данного препарата.

Проведенные исследования позволяют заключить, что после курсового парентерального введения животным препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц один раз в день, в течение 14 дней значимых отличий в физиологических и биохимических показателях у животных подопытной и контрольной группы не наблюдалось.

Клинический анализ периферической крови показал, что внутримышечное введение препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц один раз в день, на протяжении 14 дней не приводит к достоверному изменению гематологических показателей крови. Данные показатели не отличаются от значений контрольной группы животных на всем протяжении опыта.

При исследовании влияния препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на основные показатели метаболизма в хроническом эксперименте отличий между опытной и контрольной группами не выявлено.

При длительном парентеральном введении препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц один раз в день, в течение 14 дней, отклонений физиологических значений основных показателей мочи не выявлено.

Показатели, характеризующие состояние центральной нервной системы и работоспособности животных опытной группы, достоверно не отличаются от показателей выявленных у контрольной группы животных.

Курсовое парентеральное введение животным препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц 1 раз в день в течение 14 дней не привели к статистически значимому изменению динамики прироста массы тела у опытных животных по сравнению с контрольными. Кроме

того, массовые коэффициенты органов и динамика прироста живой массы у животных опытных групп находятся на одном уровне с контролем и достоверно от него не отличаются.

Оценка раздражающего действия препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на кожу кроликов

Целью настоящего исследования явилась оценка раздражающего действия препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц методом накожной аппликации в течение 20 суток, кроликов породы Шиншила и при последующей 14-дневной отмене аппликаций.

Объектом исследования служили разработанные нами препараты:

- водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ);
- силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС);
- силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ).

Настоящее исследование является доклиническим изучением безопасности оригинального лекарственного средства. Исследования, которые проводят на лабораторных животных, предоставляют наиболее полную информацию об местно-раздражающем действии лекарственного препарата, который предлагается для применения у домашних животных.

Дизайн и организация исследования направлены на решение поставленной цели и базируются на общих принципах организации исследований по оценке раздражающего действия лекарственных препаратов на лабораторных животных (таблица 26).

Таблица 26 - Дизайн опыта по местно-раздражающим свойствам препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц

Группа	Вид, пол животных	Кол-во животных в группе	Препарат (вариант опыта)	Место аппликации	Дозы, мг/кг	Объем раствора для аппликации, мл/животное	Режим введения, экспозиция
1	Кролики-самцы породы Шиншила	10	«СилимаринаМ» (испытуемый препарат)	Правый бок	1	1-5	Накожно, 1 раз в день, 20 дней, 4 часа
			Контрольное вещество	Левый бок			
2	Кролики-самцы породы Шиншила	10	«СилимаринК3» (испытуемый препарат)	Правый бок	1	1-5	Накожно, 1 раз в день, 20 дней, 4 часа
			Контрольное вещество	Левый бок			
3	Кролики-самцы породы Шиншила	10	«СилимаринК3» (испытуемый препарат)	Правый бок	1	1-5	Накожно, 1 раз в день, 20 дней, 4 часа
			Контрольное вещество	Левый бок			

Кролики являются стандартными объектами для доклинических испытаний токсичности потенциальных лекарственных средств. Кролики рекомендуются в нормативных документах в качестве одних из наиболее адекватных тест-систем для исследования общетоксических свойств потенциальных фармацевтических препаратов.

Подбор животных в группы проводили произвольно методом «Случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела кроликов не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 20%. Животных взвешивали на весах PA2102C (OHAUS).

Каждая опытная группа кроликов по испытанию местно-раздражающего действия на кожу кроликов массой 2,5 – 3,5 кг состояла из 10 животных.

Каждое животное имело отчетливо детектируемую метку (раствором пикриновой кислоты); на этикетке на клетке указано название опыта, его продолжительность, номер группы, количество животных, ответственное лицо и т.д.

Подготовку к опыту кроликов, мышей и морских свинок проводили в соответствии с указаниями ОФС «Аномальная токсичность» ГФ XII (2). Перед опытом у животных отбирали корм и воду. Через два часа животных взвешивали и распределяли по группам. За 2 дня до начала эксперимента у кроликов тщательно выстригли ножницами на спине участки размером 7 x 8 см на симметричных участках спины по обе стороны от позвоночника, оставляя волосяной покров между ними в 2 см.

Определение местного раздражающего действия проводили методом кожной пробы на 10 кроликах породы шиншилла массой $2,97 \pm 0,3$ кг (рисунок 7). В соответствии с (А.Н. Миронов, 2012).



Рисунок 7 – Оценка раздражающего действия препарата на кожу кроликов

За 2 дня до эксперимента тщательно выстригли ножницами на спине участки размером 7 x 8 см на симметричных участках спины по обе стороны от позвоночника, оставляя волосяной покров между ними в 2 см. Правый бок служил для аппликации раствора препарата, левый - для контроля. На время экспозиции

для исключения слизывания препарата с кожи животных фиксировали воротником из пластика.

Время экспозиции 4 часа. Повторные экспозиции – ежедневно в течение 20 дней. После окончания эксперимента за животными вели наблюдение в течение 14 дней.

Исследуемые препараты наносили в нативном виде из расчета 1 мл на 1 кг массы кролика на выстриженный участок на правом боку кролика. На левый бок наносили такое же количество 0,9 % раствор натрия хлорида («Контрольное вещество»).

Выраженность эритемы определяли визуально и оценивали в баллах по шкале от 0 (отсутствие эритемы) до 4 (Резко выраженная (ярко-красный тон).

Наблюдение за реакцией кожи осуществляли при естественном или близком к естественному искусственном освещении. Оценивали степень кожной реакции, включая эритему и отек, в соответствии с классификацией, представленной в таблице 27, для каждого участка и каждого интервала времени наблюдения.

Регистрировали состояние кожи в месте аппликации через 1 ч после удаления образца и непосредственно перед следующей аппликацией. После последней аппликации регистрировали состояние каждого участка через 1, 24, 48 и 72 ч после снятия образцов.

Оценку результатов проводили по индексу суммарного раздражения. Определяют индекс суммарного раздражения выполняя сложения баллов раздражения для каждого животного, включая эритемы и отеки, в каждый интервал времени. Делили полученное число на общее число наблюдений и получали средний балл раздражения для каждого животного.

Таблица 27 - Система классификации кожных реакций

Реакция	Оценка в баллах
Эритема и образование струпа	
Отсутствие эритемы	0
Очень слабая эритема (едва заметная)	1
Хорошо различимая эритема	2
Умеренная эритема	3
Резко выраженная эритема (темно-красная) с образованием струпа	4
Образование отека	
Отсутствие отека	0
Очень слабый отек (слегка заметный)	1
Заметный отек, выступающий над поверхностью кожи и имеющий четко выраженные границы	2
Умеренный отек (выступающий над поверхностью кожи около 1 мм)	3
Выраженный отек (распространенный, выступающий над поверхностью кожи более чем на 1 мм)	4
Максимально возможное число баллов	8

Для получения индекса суммарного раздражения складывали средние баллы раздражения всех подопытных животных и делили на число особей.

Индекс суммарного раздражения сравнивали со значениями, представленными в таблице 28, и регистрировали в отчете об исследовании.

Таблица 28 — Степени ответной реакции на раздражение у кроликов

Ответная реакция	Число баллов
Незначительная	От 0 до 0,4
Слабая	От 0,5 до 1,9
Умеренная	От 2,0 до 4,9
Выраженная	От 5,0 до 8,0

Этот эксперимент позволяет выявить опасность развития неаллергического контактного дерматита в зависимости от дозы изучаемого фармакологического вещества.

Результаты испытания раздражающего действия препарата «Шампунь лечебный с хлоргексидином» на кожу кроликов представлены в таблице 29.

Таблица 29 - Результаты изучения раздражающего действия препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на кожу кроликов

Номер кролика	Количество нанесенного препарата, мл	Индекс суммарного раздражения	Количество нанесенного препарата, мл	Индекс суммарного раздражения	Количество нанесенного препарата, мл	Индекс суммарного раздражения
	Мицелярный силимарин		Селен и силимарин		Золото и силимарин	
1	2,82	0,425	3	0,39	3,19	0,38
2	2,84	0,45	3,21	0,4	3,17	0,34
3	2,87	0,425	2,99	0,36	2,73	0,36
4	2,94	0,425	3,04	0,4	2,96	0,34
5	2,97	0,4	3,13	0,35	2,8	0,35
6	2,95	0,45	3,04	0,36	2,99	0,4
7	2,83	0,425	3,24	0,38	2,74	0,35
8	3,08	0,425	2,99	0,35	3,22	0,39
9	2,87	0,45	3,25	0,4	2,86	0,39
10	3	0,45	3,16	0,41	3,24	0,34
M±m	2,92±0,09	0,43±0,02	3,11±0,11	0,38±0,02	2,99±0,2	0,36±0,02

В результате проведенного эксперимента установлено, что у большинства животных через час после удаления препаратов с кожи животных отмечали едва заметное покраснение кожного покрова, которое исчезало через 3-4 часа. К следующему нанесению препарата на кожу кролика проявлений раздражения не наблюдали.

Таким образом, согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-10—2011 лекарственные препараты на основе коллоидных частиц и полимерных матриц обладают слабой степенью ответной реакции на раздражение у кроликов.

Оценка раздражающего действия препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на слизистую оболочку глаз

Цель настоящего исследования явилась оценка раздражающего действия препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на слизистую оболочку глаз кроликов.

Объектом исследования служили разработанные нами препараты:

- водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ);
- силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС);

- силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ).

Дизайн и организация исследования направлены на решение поставленной цели и базируются на общих принципах организации исследований по оценке раздражающего действия лекарственных препаратов на лабораторных животных (таблица 30).

Таблица 30 - Дизайн опыта по местно-раздражающим свойствам препаратов

Группа	Вид, пол животных	Кол-во животных в группе	Препарат (вариант опыта)	Место аппликации	Объем раствора для аппликации, мл/животное	Режим введения, экспозиция
1	Кролики-самцы породы Шиншилла	5	«СилимаринМ» (испытуемый препарат)	Правый глаз	0,02 – 0,05	конъюнктивально, однократно
			0,9% раствор натрия хлорида	Левый глаз		
2	Кролики-самцы породы Шиншилла	5	«СилимаринКС» (испытуемый препарат)	Правый глаз	0,02 – 0,05	конъюнктивально, однократно
			0,9% раствор натрия хлорида	Левый глаз		
3	Кролики-самцы породы Шиншилла	5	«СилимаринКЗ» (испытуемый препарат)	Правый глаз	0,02 – 0,05	конъюнктивально, однократно
			0,9% раствор натрия хлорида	Левый глаз		

Кролики являются стандартными объектами для доклинических испытаний токсичности потенциальных лекарственных средств. Кролики рекомендуются в нормативных документах в качестве одних из наиболее адекватных тест-систем для исследования общетоксических свойств потенциальных фармацевтических препаратов.

Подбор животных в группы проводили произвольно методом «Случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 20%. Животных взвешивали на весах РА2102С (ОНАУС).

Каждая опытная группа кроликов по испытанию раздражающего действия на слизистую оболочку глаза массой 2,5 – 3,5 кг состояла из 5 животных.

Изучение раздражающего действия на слизистые оболочки проводили на 5 кроликах породы шиншилла массой 2,5 -3,5 кг, которым в конъюнктивный мешок правого глаза закапывали по 1 капле растворов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц. Левый глаз был контрольным, в него закапывали 0,9% раствор натрия хлорида. После инстилляций веки соединяли и держали в таком положении в течение 1 с.

За 24 ч до начала испытания визуально проверяли оба глаза каждого кролика на предмет обнаружения отклонений от нормы.

Реакцию учитывали непосредственно после инстилляций препаратов и через 4 часа после внесения, а также через 24, 48, 72, и 96 часов.

Количественная оценка повреждающего действия зоошампуня на слизистые оболочки глаз кроликов проводилась по следующим критериям (классификация А. Majda, К. Chrusaieleleska, 1973).

А. Гиперемия конъюнктивы и роговицы:

- | | |
|--------------------------------------|---------|
| 1. Сосуды инъецированы | 1 балл |
| 2. Отдельные сосуды трудно различимы | 2 балла |
| 3. Диффузное глубокое покраснение | 3 балла |

Б. Отек век:

- | | |
|---|---------|
| 1. Слабый отек | 1 балл |
| 2. Выраженный отек с частичным выворачиванием век | 2 балла |
| 3. В результате отека глаз закрыт на половину | 3 балла |
| 4. В результате отека глаз закрыт более чем на половину | 4 балла |

В. Выделение:

- | | |
|--|---------|
| 1. Минимальное количество в углу глаза | 1 балл |
| 2. Количество выделений увлажняет веки | 2 балла |
| 3. Количество выделений увлажняет веки и окружающую кожу | 3 балла |

Сенсибилизацию животных осуществляли в соответствии со способом введения тестируемого препарата в клинику. Для постановки пробы 1 каплю раствора препарата вводили глазной пипеткой с вытянутым тонким концом под

верхнее веко получающим препарат и контрольным кроликам, во второй глаз (контрольный) вводили 1 каплю воды. Закапывание производили при положении животного лежа головой вниз.

Реакции учитывали непосредственно после введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц и через 4 часа после внесения, а также через 24, 48, 72, и 96 часов.

Оценки степени повреждения глаза суммировались по всем показателям, после чего вычислялся средний суммарный балл для данной группы экспериментальных животных.

Степень выраженности раздражающего действия зоошампуня оценивали по 10-ти бальной системе: - 0 – отсутствие эффекта; 1-2 – незначительный эффект; 4-6 – умеренно выраженный эффект; 6-8 - средне выраженный эффект; 8-10 – сильно выраженный эффект.

Результаты испытания раздражающего действия препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на слизистые оболочки кроликов представлены в таблице 31.

Таблица 31 - Результаты конъюнктивной пробы на кроликах

Критерии оценки		Гиперемия конъюнктивы и роговицы	Отек век	Выделение
«СилимаринМ»	Средний суммарный балл	4,6±0,68	2±2,33	3,2±2,22
	Степень выраженности эффекта	1,63±0,09 Слабый		
«СилимаринКС»	Средний суммарный балл	4,4±0,68	2,1±2,28	3±2,15
	Степень выраженности эффекта	1,57±0,07 Слабый		
«СилимаринКЗ»	Средний суммарный балл	4,6±0,68	2,2±2,55	2,8±2,04
	Степень выраженности эффекта	1,6±0,05 Слабый		

В результате проведенного исследования установлено, что сразу после инстилляций в конъюнктивальный мешок правого глаза кролика 1 капли препарата отмечается беспокойство кролика с почесыванием глаза лапой, сужение глазной щели, заметное легкое покраснение слезного протока у некоторых животных отмечали покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице, слабый отек, минимальные количества выделений в углу глаза, проходящее самопроизвольно в течение 24-48 часов. Данный факт указывает на слабый эффект раздражающего действия препаратов на основе коллоидных частиц и полимерных матриц на слизистые оболочки глаз кроликов.

Оценка алергизирующих свойств препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на морских свинках

Целью настоящих исследований явилось изучение алергизирующего действия препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц методом закрытых накожных аппликаций на морских свинках.

Объектом исследования служили разработанные нами препараты:

- водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ);
- силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС);
- силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ).

Дизайн опыта по оценке алергизирующих свойств препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на морских свинках представлен в таблице 32.

Таблица 32 - Дизайн опыта по оценке аллергизирующих свойств препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на морских свинках

Группа	Вид, пол животных	Кол-во животных в группе	Препарат (вариант опыта)	Место аппликации	Объем раствора для аппликации, мл/животное	Режим введения, экспозиция
1	Морские свинки	10	«СилимаринМ» (испытуемый препарат)	Правый бок	0,3 - 0,5	Накожно, 3 дня в неделю, 3 недели, по 6 часов
2	Морские свинки	10	«СилимаринКС» (испытуемый препарат)	Правый бок	0,3 - 0,5	Накожно, 3 дня в неделю, 3 недели, по 6 часов
3	Морские свинки	10	«СилимаринКЗ» (испытуемый препарат)	Правый бок	0,3 - 0,5	Накожно, 3 дня в неделю, 3 недели, по 6 часов
4	Морские свинки	5	0,9% раствор натрия хлорида	Левый бок	0,3 - 0,5	Накожно, 3 дня в неделю, 3 недели, по 6 часов

Подбор животных в группы проводили произвольно методом «Случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела морских свинок не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 20%. Животных взвешивали на весах РА2102С (ОНАУС).

Каждая опытная группа морских свинок массой 350-400 г состояла из 10 животных, контрольная – массой 350-400 г, из 5 животных.

Изучение аллергизирующих свойств препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц проводили методом закрытых накожных аппликаций для выявления гиперчувствительности замедленного типа. В соответствии с «ГОСТ Р ИСО 10993-10-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 10. Исследования раздражающего и сенсибилизирующего действия». Исследование проводили на 10 морских свинках массой 350-400 г для каждого препарата. За 2 дня до начала эксперимента шерсть в области левой верхней части спины тщательно выстригали. Пропитывали исследуемым препаратом гигроскопичную марлевую подушечку соответствующих размеров, прикладывали ее к выстриженному участку и фиксировали акклюзионной повязкой на 6 ч.

Повторяли эту процедуру последовательно три дня в неделю в течение трех недель.

Контрольным животным проводили все процедуры в том же режиме, используя при этом контрольный раствор.

Через 14 дней после последней индукционной аппликации на выстриженный интактный участок кожи каждого животного опытной группы, фиксировали пропитанную препаратами силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц гигроскопичную марлевую подушечку. Удаляли фиксирующие приспособления и повязку через 6 ч.

Аллергизирующее действие препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц оценивали через 24 ч после провокационной пробы. Предварительно проводили удаление шерсти у всех животных на подопытных участках и окружающей их коже.

Полностью обмывали теплой водой лишнюю волос область и высушивали кожу полотенцем перед возвращением животных в клетки. Не менее чем через 2 ч после описанной выше процедуры удаления шерсти оценивали состояние исследуемых участков в соответствии с таблицей 33.

Таблица 33 - Система классификации реакции кожи (по классификации Magnusson и Kligman)

Описание ответной реакции	Баллы
Нет видимых изменений	0
Дискретная или очаговая эритема	1
Умеренная и сплошная эритема	2
Интенсивная эритема и припухлость	3

Осмотр повторяли через 48 ч после провокационного воздействия.

Если оценка в баллах, полученная в подопытной группе, равна 1 или выше, о наличии сенсibilизации говорят в том случае, если у контрольных животных этот показатель менее 1 балла. Если оценка в баллах у контрольных животных равна 1 или выше, то реакция кожи подопытных животных, которая превышает

самую сильную реакцию, наблюдаемую в контроле, является результатом сенсibilизации.

Основным составляющим компонентом настоящих исследований была характеристика сенсibilизирующего действия оригинальных препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц.

Результаты испытания сенсibilизирующего действия препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц методом закрытых накожных аппликаций у морских свинок представлены в таблице 34.

Таблица 34 - Результаты сенсibilизирующего действия препарата препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на морских свинках

1 опытная группа «СилимаринМ»			2 опытная группа			3 опытная группа			Контрольная группа		
№ живот-ного	Оценка через час.		№ живот-ного	Оценка через час.		№ живот-ного	Оценка через час.		№ живот-ного	Оценка через час.	
	24	48		24	48		24	48		24	48
1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
2	0	0	2	1	0	2	0	0	2	0	0
3	0	0	3	0	0	3	0	0	3	1	0
4	1	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0
5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0
6	0	0	6	0	0	6	0	0			
7	0	0	7	0	0	7	0	0			
8	0	0	8	0	0	8	1	0			
9	1	0	9	1	0	9	0	0			
10	0	0	10	0	0	10	0	0			
M±m	0,2±0,37	0±0	M±m	0,2±0,37	0±0	M±m	0,2±0,37	0±0	M±m	0,2±0,56	0±0

В результате проведенного эксперимента через 24 часа после провокационной пробы только у 2х животных опытной группы было выявлено незначительное покраснение кожи в области аппликации. По истечении 48 часов данные изменения исчезали. У животных контрольной группы покраснение кожи через 24 часа после провокации отмечалось только у одной особи. Реакция кожи в опытной группе животных, как и в контрольной была меньше 1.

Таким образом, согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-10—2011 препараты водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ),

силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС), силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) не обладают аллергизирующими свойствами.

Оценка иммунотоксичности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц

Целью настоящих исследований явилась оценка возможности развития иммунотоксического действия, вызванного внутрибрюшинным введением препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц или их метаболитами у мышей линии BALB/C.

Объектом исследования служили разработанные нами препараты:

- водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ);
- силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС);
- силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ).

Настоящее исследование является доклиническим изучением безопасности нового лекарственного средства. Исследования, которые проводят на лабораторных животных, предоставляют наиболее полную информацию об иммунотоксичности лекарственного препарата, который предлагается для применения у домашних животных.

Под иммунотоксическим действием традиционно понимают модифицирующее влияние ксенобиотиков и лекарственных средств на иммуногенез, включая иммуносупрессию и гиперстимуляцию иммунитета, способное привести к снижению резистентности организма к инфекции, повышению риска онкологических заболеваний, развитию аутоиммунной патологии и аллергизации организма.

Основная задача доклинического изучения влияния препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на иммунную систему состоит в том, чтобы в эксперименте на животных доказать или исключить возможность развития иммунотоксического действия, вызванного фармакологическим средством или его метаболитами.

Дизайн и организация исследования направлены на решение поставленной цели и базируются на общих принципах организации исследований по оценке иммунотоксичности лекарственных препаратов на лабораторных животных (таблица 35, 36).

Таблица 35 - Дизайн опыта по оценке сенсibiliзирующих свойств в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)

Группа	Вид, пол животных	Кол-во животных в группе	Препарат (вариант опыта)	Доза, кратность курс	Иммунизация эритроцитами барана, мл/животное	Режим введения
1	мыши-самцы массой 18-20 г	10	«СилимаринМ» (испытуемый препарат)	Внутрибрюшинно 100 мг/кг, 1 раз в день, 7 дней	0,1	подкожно, однократно
2	мыши-самцы массой 18-20 г	10	«СилимаринКС» (испытуемый препарат)	Внутрибрюшинно 100 мг/кг, 1 раз в день, 7 дней	0,1	подкожно, однократно
3	мыши-самцы массой 18-20 г	10	«СилимаринКЗ» (испытуемый препарат)	Внутрибрюшинно 100 мг/кг, 1 раз в день, 7 дней	0,1	подкожно, однократно
4	мыши-самцы массой 18-20 г	10	0,9% раствор натрия хлорида	Внутрибрюшинно 100 мг/кг, 1 раз в день, 7 дней	0,1	подкожно, однократно

Оценку сенсibiliзирующих свойств проводили с использованием реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на мышах линии Balb/c, при введении в качестве антигенов эритроцитов барана.

В основе дизайна исследования лежат методические указания «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (2005) и «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая» (2012).

Подбор животных в группы проводили произвольно методом «Случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10%. Животных взвешивали на весах PA2102C (OHAUS).

Таблица 36 - Дизайн опыта по оценке влияния препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на гуморальный иммунный ответ методом локального гемолиза (ауто-РОК)

Группа	Вид, пол животных	Кол-во животных в группе	Препарат (вариант опыта)	Доза, кратность курс	Иммунизация эритроцитами барана, мл/животное	Режим введения
1	мышь-самцы массой 18-20 г	10	«Силимарин М» (испытуемый препарат)	Внутрибрюшинно 100 мг/кг, 1 раз в день, 7 дней	0,3	Внутрибрюшинно, однократно
2	мышь-самцы массой 18-20 г	10	«СилимаринК С» (испытуемый препарат)	Внутрибрюшинно 100 мг/кг, 1 раз в день, 7 дней	0,3	Внутрибрюшинно, однократно
3	мышь-самцы массой 18-20 г	10	«СилимаринК 3» (испытуемый препарат)	Внутрибрюшинно 100 мг/кг, 1 раз в день, 7 дней	0,3	Внутрибрюшинно, однократно
4	мышь-самцы массой 18-20 г	10	0,9% раствор натрия хлорида	Внутрибрюшинно 100 мг/кг, 1 раз в день, 7 дней	0,3	Внутрибрюшинно, однократно

Каждая группа мышей массой 18-20 г состояла из 10 животных.

Масса животных указана на время введения препаратов.

Каждое животное имело отчетливо детектируемую метку (раствором пикриновой кислоты); на этикетке на клетке указано название опыта, его продолжительность, номер группы, количество животных, ответственное лицо и т.д.

Подготовку к опыту мышей проводили в соответствии с указаниями ОФС «Аномальная токсичность» ГФ XII. Перед опытом у животных отбирали корм и воду. Через два часа животных взвешивали и распределяли по группам.

Препараты силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц («СилимаринМ», «СилимаринКС», «СилимаринКЗ») использовали в нативном виде. Для достижения адекватных объемов при внутрибрюшинном введении препарат разводили в соответствующем объеме воды для инъекций.

Оценку клеточного иммунитета проводили с использованием реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при введении в качестве антигенов эритроцитов барана.

Для экспериментов использовали 40 мышей-самцов линии Valb/c весом 18-20 г. Животных разделили на 4 группы. Мышам 1-й группы (10 гол.) провели курсовое введение препарата «СилимаринМ» в дозе, 100 мг/кг по лекарственной форме, 1 раз в день, 7 дней подряд.

Животным второй опытной группы провели курсовое введение препарата «СилимаринКС» в дозе 100 мг/кг по лекарственной форме, 1 раз в день, 7 дней подряд.

Животным третьей опытной группы провели курсовое введение препарата «СилимаринКЗ» в дозе 100 мг/кг по лекарственной форме, 1 раз в день, 7 дней подряд.

Животным 4 контрольной группы вводили 0,9% раствор натрия хлорида, в адекватных объемах.

Оценку влияния препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц («СилимаринМ», «СилимаринКС», «СилимаринКЗ») на гуморальный иммунный ответ изучали путем определения числа антителообразующих клеток (АОК) после иммунизации эритроцитами барана мышей линии Valb/c. Для иммунизации животных использовали суспензию эритроцитов барана в концентрации 0,3 %. Число АОК определяли с помощью метода локального гемолиза по Эрне и Нордину. Для этого было сформировано 4 группы мышей по 10 голов в каждой. Мышам 1-й группы (10 гол.) провели курсовое введение препарата «СилимаринМ» в дозе 100 мг/кг по лекарственной форме, 1 раз в день, 7 дней подряд.

Животным второй опытной группы провели курсовое введение препарата «СилимаринКС» в дозе 100 мг/кг по лекарственной форме, 1 раз в день, 7 дней подряд.

Животным третьей опытной группы провели курсовое введение препарата «СилимаринКЗ» в дозе 100 мг/кг по лекарственной форме, 1 раз в день, 7 дней подряд.

Животным 4 контрольной группы вводили 0,9% раствор натрия хлорида, в адекватных объемах.

В течение эксперимента вели ежедневное наблюдение за животными, учитывали клиническое состояние, выживаемость, активность, потребление корма и воды.

Оценку клеточного иммунитета проводили с использованием реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при введении в качестве антигенов эритроцитов барана.

На следующие сутки после последней инъекции препарата мышей первой и второй группы иммунизировали подкожно в межлопаточную область 10% суспензией эритроцитов барана (ЭБ) в дозе 0,1 мл. Животные 3-й группы (10 гол) служили контролем, им вводили только 10% суспензию ЭБ. Через 5 дней после окончания введения препарата всем животным вводили разрешающую дозу 2%-ной суспензии эритроцитов барана в количестве 0,02 мл в правую лапку, а в левую стерильный физиологический раствор в дозе 0,02 мл. Через 24 часа животных умерщвляли, отрезали лапки на уровне голеностопного сустава и взвешивали на аналитических весах марки DV 114C (OHAUS) для учета индекса стимуляции по формуле:

$$I_p = \frac{M_{оп} - M_{к}}{M_{к}} * 100\%, \text{ где}$$

I_p – индекс реакции,
 $M_{оп}$ – масса опытной лапы
 $M_{к}$ – масса контрольной лапы.

Оценку влияния препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на гуморальный иммунный ответ изучали путем определения числа антителообразующих клеток (АОК) после иммунизации эритроцитами барана мышей линии Balb/c.

Через 24 часа после последнего введения препарата животных внутрибрюшинно иммунизировали 0,3 мл 0,3% раствора эритроцитов барана. На 4-е сутки животных подвергали эвтаназии с помощью цервикальной дислокации, извлекали селезенки и готовили клеточную суспензию при помощи стеклянного гомогенизатора. Суспендирование проводили в растворе Хенкса (рН 7,2–7,4) в объеме 5 мл на холоде. Приготовленную суспензию фильтровали через 1 слой капрона и помещали в холодильник. Из селезенки выделяли спленоциты по общепринятой методике на градиенте плотности фикол-вероргафин. После подсчета спленоцитов в камере Горяева доводили клеточную суспензию до концентрации 1×10^7 клеток на 1 мл. Для определения количества зон гемолиза, клетки селезенки иммунизированных мышей (опытных и контрольной) с эритроцитами барана (ЭБ) помещали в агарозный гель в следующих количествах 0,5 мл агара, 50 мкл суспензии спленоцитов и 10 мкл осадка эритроцитов барана. Смесь помещали на чашки Петри. Инкубировали 1 час в термостате при температуре 37С

После инкубации к чашкам добавляли комплемент - 0,5 мл сыворотки морской свинки в разведении 1:10, и снова инкубировали 1 час в термостате при той же температуре. По окончании инкубации проводили подсчет зон гемолиза в чашках Петри опытной и контрольной групп.

Индекс стимуляции вычисляли по формуле:

$$ИС = \frac{АОК \text{ в опыте}}{АОК \text{ в контроле}}$$

Основным составляющим компонентом настоящих исследований была характеристика сенсibiliзирующего действия оригинальных препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц («СилимаринМ», «СилимаринКС», «СилимаринКЗ»).

Результаты оценки клеточного иммунитета в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) после однократного внутрибрюшинного введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц («СилимаринМ»,

«СилимаринКС», «СилимаринКЗ») при введении в качестве антигенов эритроцитов барана представлены в таблице 37.

Таблица 37 - Оценка сенсibiliзирующих свойств препаратов на основе коллоидных частиц и полимерных матриц в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при внутриверушинном введении мышам

«СилимаринМ»		«СилимаринКС»		«СилимаринКЗ»		Контроль	
№	ИР	№	ИР	№	ИР	№	ИР
1	5,13	11	5,51	21	4,3	31	5,21
2	5,12	12	5,17	22	4,76	32	5,01
3	5,36	13	5,48	23	5,89	33	5,13
4	5,26	14	5,17	24	4,92	34	5,1
5	5,05	15	5,43	25	4,95	35	5,37
6	5,39	16	5,46	26	4,45	36	5,14
7	5,46	17	5,37	27	4,48	37	5,37
8	4,99	18	5,55	28	6	38	5,34
9	5,22	19	5,3	29	5,26	39	5,04
10	5,41	20	5,13	30	5,7	40	5,34
M±m	5,24±0,16	M±m	5,36±0,16	M±m	5,07±0,62	M±m	5,21±0,14

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

ИР – индекс реакции

В ходе оценки влияния препаратов на гиперчувствительность замедленного типа установлено, что они не оказывает как стимулирующего, так и ингибирующего действия на клеточный иммунитет животного.

Из представленных данных видно, что индекс реакции в контрольной и опытной группах не имел достоверных различий. Важно отметить, что достоверных различий не отмечалось также и между опытными группами животных.

Исследования влияния препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц («СилимаринМ», «СилимаринКС», «СилимаринКЗ») на гуморальный иммунитет в реакции локального гемолиза показали (таблица 38), что курсовое парентеральное введение испытуемых веществ не оказывают как стимулирующего, так и ингибирующего действия на иммунную систему.

Таблица 38 - Исследование влияния препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на гуморальный иммунитет мышей методом локального гемолиза

1 группа		2 группа		3 группа		4 группа (контроль)		ИС «Силима- ринМ»	ИС «Силима- ринКС»	ИС «Силима- ринКЗ»
№	АОК на 5×10^5 кл	№	АОК на 5×10^5 кл	№	АОК на 5×10^5 кл	№	АОК на 5×10^5 кл			
1	65,83	1	81,3	1	73,12	1	76,44	0,9	1,1	1,0
2	80,63	2	66,58	2	71,59	2	68,37	1,1	0,9	0,9
3	78,92	3	58,84	3	68,14	3	63,41	1,0	0,8	0,9
4	75,59	4	58,52	4	65,42	4	82,71	1,0	0,8	0,9
5	56,42	5	73,22	5	64,94	5	74,33	0,7	1,0	0,8
6	60,58	6	81,18	6	68,32	6	80,75	0,8	1,1	0,9
7	59,61	7	73,44	7	71,53	7	66,12	0,8	1,0	0,9
8	75,66	8	78,22	8	78,66	8	57,61	1,0	1,0	1,0
9	82,96	9	73,35	9	76,17	9	78,31	1,1	1,0	1,0
10	63,21	10	58,87	10	71,28	10	83,56	0,8	0,8	0,9
M±m	69,9±9		70,3±9,09		70,9±4,39		73,2±8,85	0,9±0,11	0,9±0,1	0,9±0,05

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

ИС – индекс стимуляции

Проведенный эксперимент показал отсутствие иммуотропного действия препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц («СилимаринМ», «СилимаринКС», «СилимаринКЗ»), при парентеральном, курсовом введении испытуемых веществ.

Таким образом, можно заключить, что курсовое введение препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц («СилимаринМ», «СилимаринКС», «СилимаринКЗ») не обладают иммуотоксическим действием на организм животных в терапевтических дозах.

3.2.4 Безопасность применения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на наличие побочных действий при различных путях введения лабораторным и целевым животным

Целью данной работы явилось проведение исследований по оценке безопасности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на наличие побочных явлений при различных путях

введения лабораторным (мыши, морские свинки, кролики) и целевым (собаки, кошки, поросята, крупный рогатый скот) животным.

Объектом исследования служили разработанные нами препараты:

- водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ);
- силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС);
- силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ).

Оценка безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на белых мышах

Исследования проводили на белых нелинейных мышах–самцах с исходной массой 20-30г. Все животные были разделены на 3 группы, по 10 животных в каждой.

Животным 1 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 10 дней вводили водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) в 50 кратной терапевтической дозе 5000 мг/кг по лекарственной форме

Животным 2 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 10 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в 50 кратной терапевтической дозе 5000 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 3 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 10 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в 50 кратной терапевтической дозе 5000 мг/кг по лекарственной форме.

В течение 30 дней вели наблюдение за состоянием и поведением животных, регулярно проводили исследования по оценке функционального состояния, обращая внимание на двигательную активность, частоту дыхательных движений, окраску видимых участков кожи и слизистых оболочек, внешний вид животного.

Дизайн эксперимента представлен в таблице 39.

Таблица 39 – Дизайн эксперимента по оценке безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на белых мышах

Препарат	Вид животного	Концентрация препарата, мг/мл	Масса животного, г	Доза мг/кг	Количество препарата, мл	Кратность, курс
1 группа (СилимаринМ)						
СилимаринМ	Мышь	12	21,2	5000	0,11	1 раз в день, 10 дней
СилимаринМ	Мыши	12	30,17	5000	0,15	
СилимаринМ	Мыши	12	30,1	5000	0,15	
СилимаринМ	Мыши	12	30,25	5000	0,15	
СилимаринМ	Мыши	12	30,33	5000	0,15	
СилимаринМ	Мыши	12	21,6	5000	0,11	
СилимаринМ	Мыши	12	21,4	5000	0,11	
СилимаринМ	Мыши	12	21,9	5000	0,11	
СилимаринМ	Мыши	12	21	5000	0,11	
СилимаринМ	Мыши	12	21,2	5000	0,11	
2 группа (СилимаринКС)						
СилимаринКС	Мыши	12	25,8	5000	0,13	1 раз в день, 10 дней
СилимаринКС	Мыши	12	33,1	5000	0,17	
СилимаринКС	Мыши	12	27,4	5000	0,14	
СилимаринКС	Мыши	12	35,6	5000	0,18	
СилимаринКС	Мыши	12	25,5	5000	0,13	
СилимаринКС	Мыши	12	29,3	5000	0,15	
СилимаринКС	Мыши	12	27,6	5000	0,14	
СилимаринКС	Мыши	12	25,7	5000	0,13	
СилимаринКС	Мыши	12	25,3	5000	0,13	
СилимаринКС	Мыши	12	25,6	5000	0,13	

Таблица 39 – Продолжение

Препарат	Вид животного	Концентрация препарата, мг/мл	Масса животного, г	Доза мг/кг	Количество препарата, мл	Кратность, курс
3 группа (СилимаринКЗ)						
СилимаринКЗ	Мыши	12	21,6	5000	0,11	1 раз в день, 10 дней
СилимаринКЗ	Мыши	12	21,4	5000	0,11	
СилимаринКЗ	Мыши	12	21,9	5000	0,11	
СилимаринКЗ	Мыши	12	31	5000	0,16	
СилимаринКЗ	Мыши	12	31,2	5000	0,16	
СилимаринКЗ	Мыши	12	21,2	5000	0,11	
СилимаринКЗ	Мыши	12	30,17	5000	0,15	
СилимаринКЗ	Мыши	12	30,1	5000	0,15	
СилимаринКЗ	Мыши	12	30,25	5000	0,15	
СилимаринКЗ	Мыши	12	30,33	5000	0,15	

Результаты проведенных исследований показали, одинаковое действие всех трех образцов испытуемых препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц. У животных непосредственно после введения лекарственных средств, наблюдались незначительная гиподинамия, взъерошенность волосяного покрова. Данное состояние приходило к норме в течение 2 часов после инъекции. Вместе с этим у всех подопытных животных не отмечалось симптомов, характерных для аллергической реакции как после однократного введения, так и после курсового введения препаратов.

Оценка безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на морских свинках

Оценку безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц проводили на

морских свинок с исходной массой 300-400 г. Все животные были разделены на 3 группы, по 5 животных в каждой (таблица 40).

Таблица 40 – Дизайн эксперимента по оценке безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на морских свинок

Препарат	Концентрация препарата, мг/мл	Масса животного, г	Доза мг/кг	Количество препарата, мл	Кратность, курс
1 группа					
СилимаринМ	12	345	300	0,10	1 раз в день, 10 дней
СилимаринМ	12	328	300	0,10	
СилимаринМ	12	364	300	0,11	
СилимаринМ	12	325	300	0,10	
СилимаринМ	12	333	300	0,10	
2 группа					
СилимаринКС	12	368	300	0,11	1 раз в день, 10 дней
СилимаринКС	12	339	300	0,10	
СилимаринКС	12	386	300	0,12	
СилимаринКС	12	356	300	0,11	
СилимаринКС	12	329	300	0,10	
3 группа					
СилимаринКЗ	12	361	300	0,11	1 раз в день, 10 дней
СилимаринКЗ	12	342	300	0,10	
СилимаринКЗ	12	376	300	0,11	
СилимаринКЗ	12	381	300	0,11	
СилимаринКЗ	12	371	300	0,11	

Животным 1 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 10 дней вводили водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) в 3х кратной терапевтической дозе 300 мг/кг по лекарственной форме

Животным 2 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 10 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в 3х кратной терапевтической дозе 300 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 3 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 10 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в 3х кратной терапевтической дозе 300 мг/кг по лекарственной форме.

В течение 30 дней вели наблюдение за состоянием и поведением животных, регулярно проводили исследования по оценке функционального состояния, обращая внимание на двигательную активность, частоту дыхательных движений, окраску видимых участков кожи и слизистых оболочек, внешний вид животного.

В результате проведенных исследований установлено, что курсовое введение трех образцов препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц не вызывает симптомов характерных для аллергических реакций. Наблюдение за животными показали сходную картину при введении препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц. Так у животных непосредственно после инъекции наблюдали незначительное возбуждение, проявляющееся в повышении двигательной активности, учащении дыхательных движений. Данное состояние купировалось через 20 – 30 минут после введения препаратов. Отклонения в поведении животных на введение препарата вызваны стрессом, связанным с фиксацией и инъекцией препарата (незначительная болевая реакция).

Оценка безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на кроликах

Оценку безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц проводили кроликах породы шиншилла с исходной массой 2,5 – 3 кг. Все животные были разделены на 6 групп, по 3 животных в каждой (таблица 41).

Таблица 41 – Дизайн эксперимента по оценке безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на кроликах

Препарат	Вид животного	Масса животного, кг	Доза мг/кг	Доза препарата, мл	Способ введения	Кратность, курс
1 группа						
СилимаринМ	Кролик	2,54	200	0,51	в/м	1 раз в день, 7 дней
СилимаринМ	Кролик	2,62	200	0,52		
СилимаринМ	Кролик	2,89	200	0,58		
2 группа						
СилимаринКС	Кролик	2,64	200	0,53	в/м	1 раз в день, 7 дней
СилимаринКС	Кролик	2,98	200	0,60		
СилимаринКС	Кролик	2,56	200	0,51		
3 группа						
СилимаринКЗ	Кролик	2,84	200	0,57	в/м	1 раз в день, 7 дней
СилимаринКС	Кролик	2,98	200	0,60		
СилимаринКС	Кролик	2,56	200	0,51		
4 группа						
СилимаринМ	Кролик	2,76	200	0,55	в/в	1 раз в день, 7 дней
СилимаринМ	Кролик	2,78	200	0,56		
СилимаринМ	Кролик	2,63	200	0,53		
5 группа						
СилимаринКС	Кролик	2,89	200	0,58	в/в	1 раз в день, 7 дней
СилимаринКС	Кролик	2,58	200	0,52		
СилимаринКС	Кролик	2,95	200	0,59		
6 группа						
СилимаринКС	Кролик	2,84	200	0,57	в/в	1 раз в день, 7 дней
СилимаринКС	Кролик	2,61	200	0,52		
СилимаринКС	Кролик	2,98	200	0,60		

Животным 1 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) в 2х кратной терапевтической дозе 200 мг/кг по лекарственной форме

Животным 2 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в 2х кратной терапевтической дозе 200 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 3 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в 2х кратной терапевтической дозе 200 мг/кг по лекарственной форме.

Животным 4 опытной группы внутривенно ежедневно в течение 7 дней вводили водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) в 2х кратной терапевтической дозе 200 мг/кг по лекарственной форме

Животным 5 опытной группы внутривенно ежедневно в течение 7 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в 2х кратной терапевтической дозе 200 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 6 опытной группы внутривенно ежедневно в течение 7 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в 2х кратной терапевтической дозе 200 мг/кг по лекарственной форме.

Внутривенное введение осуществляли в поверхностную краевую вену ушной раковины с соблюдением правил асептики и антисептики.

В течение 14 дней вели наблюдение за состоянием и поведением животных, регулярно проводили исследования по оценке функционального состояния, обращая внимание на двигательную активность, частоту дыхательных движений, окраску видимых участков кожи и слизистых оболочек, внешний вид животного.

В результате проведенных исследований установлено, что курсовое внутримышечное введение препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в 2 кратной терапевтической дозе кроликам породы шиншилла не вызывает симптомов характерных для аллергических реакций. Наблюдение за животными показали сходную картину при внутримышечном введении препаратов силимарина на основе коллоидных

частиц (селена и золота) и полимерных матриц. Внутримышечное введение препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц не приводило к заметным нарушениям клинического состояния животных в течение 2 часов непосредственного наблюдения, от момента введения препаратов животные вели себя спокойно, принимали пищу, двигательная активность, внешний вид, частота дыхательных движений и окраска кожи и слизистых оболочек оставалась без изменений по сравнению с началом опыта.

Результаты внутривенного введения животным препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц показали, аналогичную картину, как и при ежедневном внутримышечном введении.

Оценка безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на поросятах

Оценку безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц проводили поросятах отъемышах 2х месячного возраста, массой 14 – 19 кг. Все животные были разделены на 6 групп, по 3 животных в каждой (таблица 42).

Таблица 42 – Дизайн эксперимента по оценке безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на поросятах отъемного периода

Препарат	Вид животного	Масса животного, кг	Доза мг/кг	Доза препарата, мл	Способ введения	Кратность, курс
1 группа						
СилимаринМ	Поросята-отъемыши	14,9	100	1,5	в/м	1 раз в день, 5 дней
СилимаринМ	Поросята-отъемыши	15,6	100	1,6		
СилимаринМ	Поросята-отъемыши	16,1	100	1,6		

Таблица 42 – Продолжение

2 группа						
СилимаринКС	Поросята-отъемыши	15,6	100	1,6	в/м	1 раз в день, 5 дней
СилимаринКС	Поросята-отъемыши	17,2	100	1,7		
СилимаринКС	Поросята-отъемыши	14,8	100	1,5		
3 группа						
СилимаринКЗ	Поросята-отъемыши	18,6	100	1,9	в/м	1 раз в день, 5 дней
СилимаринКЗ	Поросята-отъемыши	16,8	100	1,7		
СилимаринКЗ	Поросята-отъемыши	15,2	100	1,5		
4 группа						
СилимаринМ	Поросята-отъемыши	15,6	100	1,6	в/в	однократно
СилимаринМ	Поросята-отъемыши	17,4	100	1,7		
СилимаринМ	Поросята-отъемыши	16,1	100	1,6		
5 группа						
СилимаринКС	Поросята-отъемыши	15,4	100	1,5	в/в	однократно
СилимаринКС	Поросята-отъемыши	14,6	100	1,5		
СилимаринКС	Поросята-отъемыши	15,8	100	1,6		
6 группа						
СилимаринКЗ	Поросята-отъемыши	14,8	100	1,5	в/в	однократно
СилимаринКЗ	Поросята-отъемыши	16,7	100	1,7		
СилимаринКЗ	Поросята-отъемыши	15,2	100	1,5		

Животным 1 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 5 дней вводили водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме

Животным 2 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 5 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 3 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 5 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме.

Животным 4 опытной группы внутривенно ежедневно в течение 5 дней вводили водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме

Животным 5 опытной группы внутривенно ежедневно в течение 5 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 6 опытной группы внутривенно ежедневно в течение 5 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме.

Внутривенное введение препарата осуществляли в поверхностную вену ушной раковины, при помощи одноразовых шприцев, с соблюдением правил асептики и антисептики.

В течение 7 дней вели наблюдение за состоянием и поведением животных, регулярно проводили исследования по оценке функционального состояния, обращая внимание на двигательную активность, частоту дыхательных движений, окраску видимых участков кожи и слизистых оболочек, внешний вид животного.

В результате проведенных исследований установлено, что курсовое внутримышечное введение препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в терапевтической дозе 100 мг/кг поросятам-отъемышам не вызывает симптомов характерных для аллергических реакций. Наблюдение за животными показали сходную картину при

внутримышечном введении. Внутримышечное введение препаратов не приводило к заметным нарушениям клинического состояния животных в течение 2 часов непосредственного наблюдения, от момента введения препаратов животные вели себя спокойно, принимали пищу, двигательная активность, внешний вид, частота дыхательных движений и окраска кожи и слизистых оболочек оставалась без изменений по сравнению с началом опыта.

Результаты внутривенного введения животным препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц показали, аналогичную картину, как и при ежедневном внутримышечном введении. Симптомов характерных для аллергической реакции немедленного типа после однократного введения в терапевтической дозе препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц не отмечалось. В течение 2 часов непосредственного наблюдения, а также через 24 часа от начала опыта животные вели себя спокойно, принимали пищу, двигательная активность, внешний вид, частота дыхательных движений и окраска кожи и слизистых оболочек оставалась без изменений по сравнению с началом опыта.

Оценка безопасности парентерального (внутривенного) введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на кошках

Оценку безопасности парентерального введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц проводили на 10 кошках в возрасте от 1 до 10 лет. Все животные были разделены на 3 группы (таблица 43).

Животным 1 группы (n=3) внутривенно, в подкожную вену предплечья передней конечности, вводили струйно водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) из расчёта 100 мг/кг живой массы.

Животным 2 группы (n=3) внутривенно, в подкожную вену предплечья передней конечности, вводили струйно силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 3 группы (n=4) внутривенно, в подкожную вену предплечья передней конечности, вводили струйно силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме.

Место инъекции выстригали и обрабатывали 70% этиловым спиртом, скорость введения препарата не более - 1 мл/5 сек. Температура исследуемых препаратов 20-22°C. В течение 5 суток за животными вели наблюдение, обращая внимание на внешний вид животного, состояние сердечно-сосудистой и дыхательной системы, двигательную активность, окраску видимых участков кожи и слизистых оболочек.

Таблица 43 – Дизайн эксперимента по оценке безопасности парентерального (внутривенного) введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на кошках

Кличка, возраст	Порода, пол	Масса тела, кг	Доза препарата	Аллергич. реакция
1 группа				
Макс, 4 г	б/п, кот	4,1	0,4	-
Без клички, ~2-3 г	б/п, кот	5,1	0,5	-
Василиса, 8 л	б/п, кошка	2,6	0,3	-
2 группа				
Пушок, 2 г	б/п, кот	4,8	0,5	-
Без клички, ~5 - 6 л	б/п, кошка	2,7	0,3	-
Багги, 7 лет	б/п, кошка	3,4	0,3	-
3 группа				
Без клички, ~3 – 4 г	б/п, кот	3,8	0,4	-
Мурка, 1,5 г	б/п, кошка	3,6	0,4	-
Без клички, ~2-3 г	б/п, кошка	2,7	0,3	-
Без клички, ~2-3 г	б/п, кот	4,6	0,5	-

Результаты проведенных исследований показали отсутствие у всех подопытных кошек симптомов, характерных для аллергической реакции

немедленного типа после однократного введения в терапевтической дозе препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц. В течение 2 часов непосредственного наблюдения, а также через 24 часа от начала опыта животные вели себя спокойно, принимали пищу, двигательная активность, внешний вид, частота дыхательных движений и окраска кожи и слизистых оболочек оставалась без изменений по сравнению с началом опыта.

Необходимо отметить, что всем животным через 24 часа после внутривенного введения образцов препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц, провели повторное введение лекарственных средств внутримышечно в тех же дозах. Симптомов, характерных для интоксикации и аллергической реакции не наблюдалось.

Оценка безопасности парентерального (внутривенного) введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на собаках

Оценку безопасности парентерального введения препарата «Гепасейф» проводили на 9 собаках в возрасте от 3 мес до 12 лет. Все животные были разделены на 3 группы, по 3 животных в каждой (таблица 44).

Животным 1 группы внутривенно, в подкожную вену предплечья передней конечности, вводили струйно водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) из расчёта 100 мг/кг живой массы;

Животным 2 группы внутривенно, в подкожную вену предплечья передней конечности, вводили струйно силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 3 группы внутривенно, в подкожную вену предплечья передней конечности, вводили струйно силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме..

Место инъекции выстригали и обрабатывали 70% этиловым спиртом, скорость введения препарата не более - 1 мл/5 сек. Температура исследуемых препаратов 20-22°C. В течение 5 суток за животными вели наблюдение, обращая внимание на внешний вид животного, состояние сердечно-сосудистой и дыхательной системы, двигательную активность, окраску видимых участков кожи и слизистых оболочек.

Таблица 44 – Дизайн эксперимента по оценке безопасности парентерального (внутривенного) введения препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в опыте на собаках

Кличка, возраст	Порода, пол	Масса тела, кг	Доза препарата	Аллергич. реакция
1 группа				
Роксана, 3,6 г	б/п, сука	26	2,6 мл	+
Лютый, 2,5 г	б/п, кобель	4,5	0,5 мл	+
Боня, 2,1г	метис, кобель	12	1,2 мл	-
2 группа				
Рекс, 12 лет	б/п, кобель	7	1,2 мл	-
Джина, 3,5 г	кав. овчарка	35	3,5 мл	-
Без клички, ~3мес	б/п, кобель	3,6	0,4 мл	-
3 группа				
Без клички, ~3мес	б/п, сука	3,1	0,4 мл	-
Без клички, ~3мес	б/п, сука	2,5	0,3 мл	-
Без клички, ~3мес	б/п, кобель	3,4	0,4 мл	-

По итогам проведённых исследований было установлено 2 наблюдения, при которых развивалась аллергическая реакция. Данные нарушения возникали у собак, которым внутривенно вводили водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ)

У животных которым внутривенно вводили препараты на основе коллоидных частиц - «СилимаринКС» и «СилимаринКЗ» ни каких побочных явлений не отмечали.

Аллергическая реакция немедленного типа сопровождалась следующими симптомами: кратковременно возбуждение (беспокойство) животного в течении 1-2 минут, которое сменялось угнетением, переходящим в ступор. Со стороны сердечно-сосудистой системы – тахикардия (до ритма галопа), цианоз слизистых, реже – отёки в области нижнечелюстного пространства и подгрудка. Со стороны дыхательной системы – тахипное (поверхностное учащённое дыхание). Реже – произвольный акт мочеиспускания и дефекации.

Купирование данных приступов осуществляли посредством внутримышечного введения препарата «Дексаметазон» в дозе 1-2 мл/животное. Так же использовали дыхательные analeптики и препараты, относящиеся к группе стимуляторов дыхания – «Кордиамин» и «Сульфокамфокаин» в дозе 1-2 мл/животное.

Необходимо акцентировать внимание на следующий фактор через 5 дней данным животным в тех же дозировках снова вводили препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц, но уже внутримышечно. Аллергической реакции не наблюдалось.

3.2.5. Специфическая гепатопротекторная активность препаратов на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в экспериментах на изолированных гепатоцитах (in vitro) и лабораторных животных (in vivo)

Печень является органом с очень широким функционально-метаболическим профилем, и поэтому она составляет предмет огромного количества биохимических исследований. Главное ее назначение в организме — трансформация биоактивных веществ в такие физические и химические формы, которые, с одной стороны, могли бы быть использованы в дальнейшем организмом, а с другой — подвергнуты экскреции.

В печени огромное количество функций выполняется только одним типом — паренхиматозными клетками, или гепатоцитами. Они составляют подавляющее большинство в весовом отношении и 2/3 общего объема всей клеточной популяции. Эта относительная морфологическая гомогенность печени, так же, как и связь гепатоцитов с органно-специфической ее функцией, делает очень выгодным использование паренхиматозных клеток в качестве модельной системы для исследования самых различных вопросов биохимического, биофизического» фармакологического и физиологического профиля.

3.2.4.1 Специфическая гепатопротекторная активность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в экспериментах на культуре изолированных гепатоцитов (in vitro) печени крыс

Применение гепатоцитов в качестве биологического объекта имеет целый ряд преимуществ. Гепатоциты существенно увеличивают количественные возможности эксперимента сравнительно с целой печенью, при том что они сохраняют интактной внутриклеточную ультраструктуру, необходимую для адекватного воспроизведения на клеточном уровне специфических реакций целого органа.

Поэтому целью настоящего исследования явилось изучение специфической гепатопротекторной активности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в экспериментах на культуре изолированных гепатоцитов (in vitro) печени крыс.

Объектом исследования служили разработанные нами препараты:

- водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ); силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС); силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ).

Для изучения гепатопротекторных свойств полученного препарата проводили исследование на культуре изолированных гепатоцитов.

Культуры клеток были получены по методике, описанной в «Current Protocols in Cell Biology». (Wiley John, 2003)

Схема эксперимента представлена в таблице 45. Для проведения эксперимента были приготовлены образцы препаратов «СилимаринМ», «СилимаринКС» и «СилимаринкзКЗ» в питательной среде для инкубации гепатоцитов с концентрацией 0,1 мг/мл по лекарственной форме. Измерение концентраций проводили по лекарственной форме, растворяли необходимое количество препарата в питательной среде инкубации. В качестве гепатотоксина использовали 2 ммоль раствор тетрахлорметана (CCl₄). (А.Н. Миронов, 2012). Полученные клетки были разделены на опытные образцы согласно «Таблице 2.1 Схема эксперимента».

В среду для инкубации которых вносили исследуемые препараты в дозе 0,1 мг/мл по лекарственной форме в 6 повторностях и гепатотоксин (тетрахлорметан) до концентрации 2 ммоль.

Первая проба (n=6) состояла из культуры гепатоцитов и питательной среды для инкубации. Во вторую пробу (n=6) наряду с ксенобиотиком вносили до концентрации 0,1 мг/мл водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ). В третью пробу (n=6) вносили ксенобиотик и силимарин конъюгированный с коллоидным селеном. В четвертую пробу (n=6) – ксенобиотик и силимарин конъюгированный с коллоидным золотом. Пятая проба (n=6) в среду для инкубации вносили четыреххлористый углерод 2 ммоль. В шестой пробе (n=6) к культуральной жидкости добавляли препарат «СилимаринМ» до концентрации 0,1 мг/мл. В седьмую пробу (n=6) вносили препарат «СилимаринКС» до концентрации 0,1 мг/мл. В восьмую пробу (n=6) – «СилимаринКЗ» до концентрации 0,1 мг/мл.

Жизнеспособность гепатоцитов оценивали в МТТ тесте с нитротетразолевым синим бромидом по способности митохондриальных дегидрогеназ гепатоцитов восстанавливать нитротетразолевый синий бромид до формазана. Целостность клеточных мембран оценивали по активности трансаминаз (АЛТ, АСТ, ЛДГ) в среде инкубации.

Таблица 45 – Схема эксперимента по изучению гепатопротекторной активности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц

Субстрат, (мл)	1 проба (n=6)	2 проба (n=6)	3 проба (n=6)	4 проба (n=6)	5 проба (n=6)	6 проба (n=6)	7 проба (n=6)	8 проба (n=6)
	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)	Культура гепатоцитов (5x10 ⁵ кл/мл)
	2 ммоль тетрахлорметан							
Анализируемый образец, (0,01 мг/мл)	-	СилимаринМ	СилимаринКС	СилимаринКЗ	-	СилимаринМ	СилимаринКС	СилимаринКЗ
	Инкубируем при 37 ⁰ С 1 час							
	Центрифугируем при 1000 об/мин, 10 мин							
Для определения ферментов цитолиза	150	150	150	150	150	150	150	150
	Осадок используем для определения жизнеспособности гепатоцитов в МТТ-тесте							

При анализе полученных данных установлено, что внесение лекарственных препаратов на основе коллоидных частиц и полимерных матриц в дозе 0,1 мг/мл препятствует гепатотоксическому действию ССl₄ (таблица 46). В образцах с отрицательным контролем отмечается снижение дыхательной активности клеток на 25% по сравнению с контролем. Кроме того, в образцах, содержащих только препарат коллоидный селен и силимарин без токсина, отмечается достоверное увеличение дыхательной активности гепатоцитов на 29% по сравнению с контролем.

Таблица 46 – Дыхательная активность гепатоцитов

Название образца	Концентрация восстановленного формазана в культуре клеток, мкг/мл
Клеточная культура (Фон)	0,048 ±0,003
Клеточная суспензия+ «СилимаринМ» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	0,049±0,005
Клеточная суспензия+ «СилимаринКС» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	0,054±0,006
Клеточная суспензия+ «СилимаринКЗ» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	0,048±0,002
Клеточная культура + 2 ммоль ССl ₄ (Отрицательный контроль)	0,036±0,003*
Клеточная суспензия+ «СилимаринМ» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	0,051±0,002
Клеточная суспензия+ «СилимаринКС» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	0,062±0,005*
Клеточная суспензия +«СилимаринКЗ» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	0,049±0,004

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

В результате определения активности ферментов в среде инкубации установлено (таблица 47) повышение активности аланиновой аминотрансферазы в клеточной суспензии с внесением гепатотоксина в 3 раза относительно фоновых значений. Вместе с этим наблюдается повышение активности и в среде инкубации где наряду с гепатотоксином вносили испытуемые препараты в среднем на 70 %, что достоверно ниже чем в отрицательном контроле. Тогда как внесение в инкубационную среду разработанных нами препаратов не оказывало влияния на активность данного фермента в инкубационной среде, где данный показатель не отличался от контрольных значений. Аналогичная динамика прослеживалась и в ходе определения активности аспартат и аланинаминотрансферазы и

лактатдегидрогеназы. Учитывая тот факт, что данные ферменты являются внутриклеточными субстратами и выполняют свою функцию во внутриклеточном пространстве. Соответственно повреждение клеточных мембран приводит к высвобождению данных ферментов во внеклеточное пространство где активность их возрастает.

Таблица 47 – Активность ферментов цитолиза в среде для инкубации гепатоцитов

Название образца	АЛТ, Е/л	АСТ, Е/л	ЛДГ, Е/л
Клеточная культура (Фон)	28±2,4	18±1,6	238±12
Клеточная суспензия+ «СилимаринМ» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	41±3,2*	29±2,1*	316±15*
Клеточная суспензия+ «СилимаринКС» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	39±3,6*	25±2,8*	301±18*
Клеточная суспензия+ «СилимаринКЗ» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	43±3,1*	28±2,3*	319±25*
Клеточная культура + 2 ммоль ССl ₄ (Отрицательный контроль)	97±4,2*	69±5,3*	562±32*
Клеточная суспензия+ «СилимаринМ» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	25±2,8	17±1,8	243±21
Клеточная суспензия+ «СилимаринКС» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	29±2,4	21±1,6	229±18
Клеточная суспензия +«СилимаринКЗ» 0,1 мг/мл + 2 ммоль ССl ₄	28±1,9	16±2,0	241±12

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

Наряду с этим, применение сконструированных нами препаратов силимарина на основе полимерных матриц и коллоидных частиц препятствует цитолитическому воздействию тетрахлорметана.

На основании этого можно заключить, что препараты обладают гепатозащитным эффектом, препятствуют разрушению гепатоцитов при поражении клеток токсическими веществами (ССl₄).

3.2.5.2 Терапевтическая эффективность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц при индуцированном тетрахлорметаном экспериментальном гепатите у мышей

Целью настоящих исследований явилось сравнительная оценка гепатопротекторных свойств препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на модели острого токсического гепатита у мышей индуцированном тетрахлорметаном (CCl_4).

Объектом исследования служили разработанные нами препараты:

- водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ);
- силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС);
- силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ).

На сегодняшний день, CCl_4 является одним из распространенных токсичных веществ для изучения гепатотоксичных эффектов при экспериментальном моделировании поражений печени (Т.Ф. Slater, 1981; Н. Renner, 1985).

CCl_4 -вызванная токсичность - общий термин, которым, в зависимости от дозы и продолжительности воздействия, или времени наблюдения, объединяют множество эффектов, которые в целом можно назвать токсичными.

При низких дозах преобладают переходные эффекты, такие как потеря Ca^{2+} секвестра, нарушение липидного гомеостаза, выделение вредных или полезных цитокинов и апоптоз, с последующей регенерацией. Другие эффекты, с более высокими дозами или более длительным воздействием, более серьезные, постоянные, и развиваются за более длительный промежуток времени, к ним относится жировая дистрофия, фиброз, цирроз печени, и даже рак. Кроме того, в остро токсичных дозах, когда некроз клеток печени превысит ее регенеративную способность, последует летальная печеночная недостаточность.

Поэтому четыреххлористый углерод был избран нами как эффективный токсикологический агент для постановки экспериментального гепатита.

Для определения гепатопротекторных свойств исследуемых препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц, были сформированы 5 групп белых нелинейных мышей

Дизайн и организация исследования направлены на решение поставленной цели и базируются на общих принципах организации исследований (таблица 48).

Таблица 48 – Дизайн исследований по изучению гепатопротекторных свойств на модели острого токсического гепатита у мышей

Время	Группа 1 (Положительный контроль) n=20	Группа 2 n=10	Группа 3 n=10	Группа 4 n=10	Группа 5 n=10 (Фон)
день 0	Взвешивание животных. Введение трихлорметана в оливковом масле в соотношении 50:50, в объеме 2 мл /кг				Взвешивание животных
день 1	Взвешивание животных. Умерщвление 10 голов для оценки физиологических параметров мышей*	Взвешивание животных. Введение мицелярного раствора силимарина (доза - 100 мг/кг, кратность - 1 раз в день, курс - 6 дней)	Взвешивание животных. Введение препарата селен+силимарин (доза - 100 мг/кг, кратность - 1 раз в день, курс - 6 дней)	Взвешивание животных. Введение препарата золото+силимарин (доза - 100 мг/кг, кратность - 1 раз в день, курс - 6 дней)	Взвешивание животных.
	Взвешивание животных. При гибели 50% мышей в первой опытной группе (положительный контроль). Эвтаназия для оценки физиологических параметров мышей*				
	Процедура оценки физиологических параметров				
1	Эвтаназия методом транслокации шейных позвонков Взятие крови в пробирки с активатором свертывания для определения биохимических показателей.				
2	Извлечение печени. Оценка массы печени.				
3	Растворить 1 г печени в 10 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. определения концентрации восстановленного глутатиона				

Подбор животных в группы проводили произвольно методом «Случайных чисел», используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10%. Животных взвешивали на весах PA2102C (OHAUS).

Для определения гепатопротекторных свойств исследуемых препаратов были сформированы 5 групп белых нелинейных мышей:

Первой группе из 20 голов внутрибрюшинно вводился 50% р-р четыреххлористого углерода на оливковом масле в объеме 1,22 мл/кг живой массы. Лечение животных этой группы не проводили. Эвтаназию 10 голов осуществлялся через сутки после инъекции, оставшихся животных подвергали эвтаназии при гибели 50% мышей данной группы.

Второй группе из 10 голов после введения четыреххлористого углерода проводилась терапия гепатита с применением препарата силимарина на основе полимерных матриц (СилимаринМ) в дозе 100 мг/кг по лекарственной форме, 1 раз в день, ежедневно со второго по седьмой-шестой день.

Третьей – состоящей из 10 голов после введения четыреххлористого углерода проводилась терапия гепатита с использованием препарата силимарина конъюгированного с коллоидным селеном (СилимаринКС) в дозе 100 мг/кг по лекарственной форме, 1 раз в день, ежедневно со второго по седьмой-шестой день.

Четвертой группе из 10 голов после введения четыреххлористого углерода проводилась терапия гепатита препаратом силимарина конъюгированного с коллоидным золотом (СилимаринКЗ) в дозе 100 мг/кг по лекарственной форме, 1 раз в день, ежедневно со второго по седьмой-шестой день.

Пятой группе- фоновой- инъекции не проводились.

Объём четыреххлористого углерода для провокации гепатита вводился в 50% летальной дозе.

Эвтаназию животных осуществляли методом транслокации шейных позвонков с применением средств для наркоза, с последующим взятием биологических материалов.

В ходе изучения гепатопротекторных свойств на модели острого токсического гепатита смертность лабораторных животных за 7 дней эксперимента, составила (таблица 49) в первой группе 50%, во второй, - 10 %, в четвертой опытной группе – 20 %, в третьей группе животных гибели не отмечалось и в пятой (фоновой) признаков интоксикации и гибели животных не отмечалось.

Таблица 49 - Показатели смертности и выживаемости мышей при терапии экспериментального гепатита

№ Группы	Число мышей в опыте	Число погибших мышей, через (сутки)						Итоговый результат
		1	2	3	4	5	6	
1	10	0	0	1	2	1	1	5/10
2	10	0	0	1	0	0	0	1/10
3	10	0	0	0	0	0	0	0/10
4	10	0	0	1	1	0	0	2/10
5 (фон)	10	0	0	0	0	0	0	0/10

При достижении в первой опытной группе 50 % гибели животных все животные подвергались эвтаназии путем транслокации шейных позвонков под эфирным наркозом. Предварительно животных взвешивали. После эвтаназии у мышей брали кровь, затем подвергали вскрытию. У всех животных извлекали печень, которую взвешивали. Определяли коэффициент массы печени.

При анализе гематологических показателей периферической крови мышей через 24 часа после начала эксперимента (рисунок 8) установлено достоверное повышение общего количества лейкоцитов у мышей с индуцированным тетрахлорметаном гепатитом по сравнению с контрольными животными. Увеличение общего количества лейкоцитов возникало за счет гранулоцитарных клеток. Данный факт указывает на развитие воспалительных процессов в организме животных, в частности в печени, пораженной действием тетрахлорметана. Четыреххлористый углерод (CCl_4) является широко используемым ксенобиотиком, индуцирующим поражение печени у экспериментальных животных. Тетрахлорметан индуцирует продукцию нескольких типов активных форм кислорода через цитохром P450, тем самым, вызывая повреждение печени.

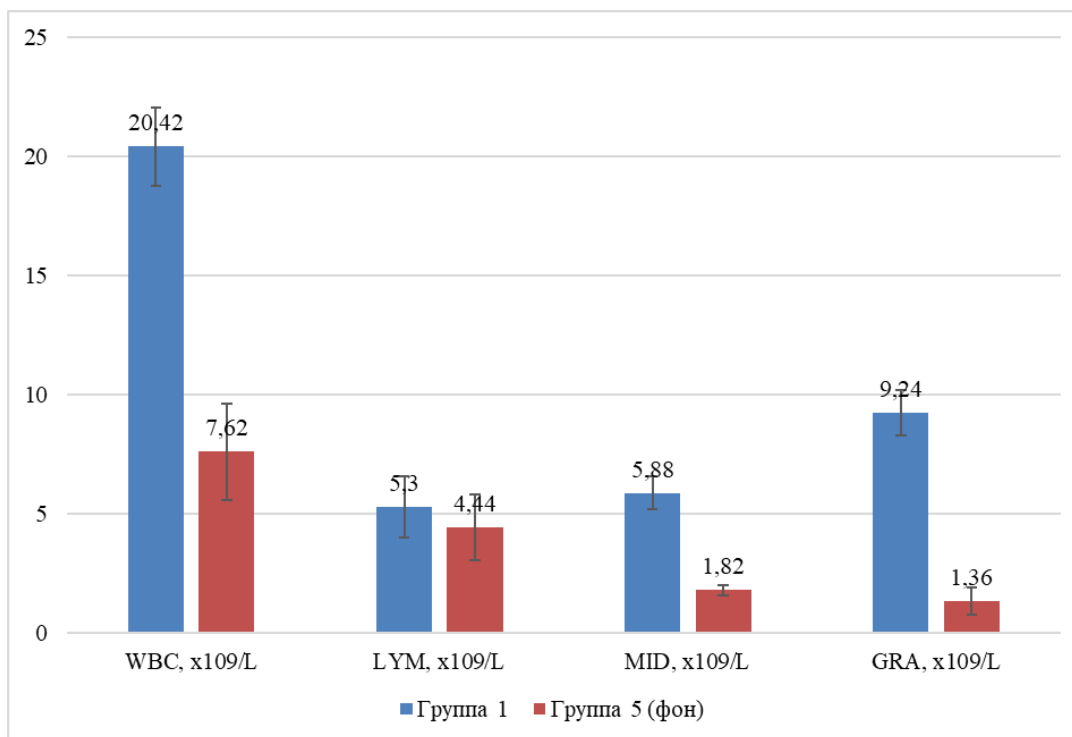


Рисунок 8 - Динамика изменений лейкоцитов через 24 часа после введения тетрахлорметана

Наряду с этим, отмечалось достоверное увеличение массы печени у животных с индуцированным гепатитом по сравнению с контрольными мышами. На данный факт указывают показатели коэффициента массы печени мышей (рисунок 9).

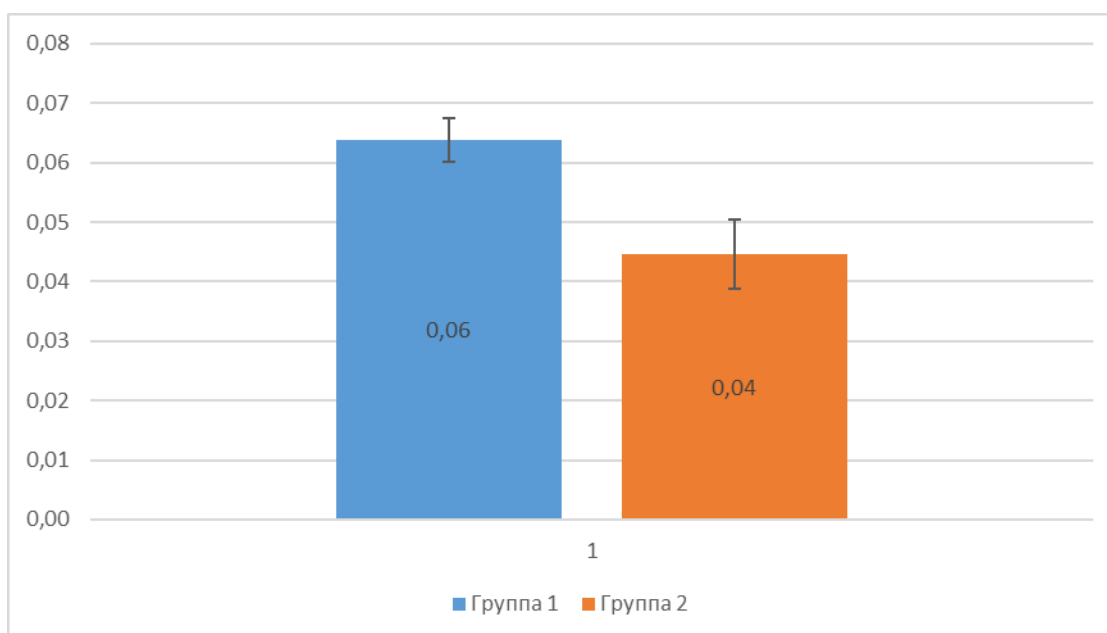


Рисунок 9 - Коэффициенты массы печени мышей через 24 часа после начала эксперимента

При анализе биохимических показателей сыворотки крови мышей (таблица 50) установлено достоверное повышение индикаторных ферментов печени аланиновой и аспарагиновой трансаминаз в сыворотке крови мышей через 24 часа после введения 50 % раствора тетрахлорметана на оливковом масле. Данные изменения указывают на способность четыреххлористого углерода запускать процессы перекисного окисления липидов и снижать интегральную антирадикальную активность в печени, что в свою очередь приводит к повреждению клеточных мембран центрлобулярных долек печени (Kropotov A.V., 2004; Shabanov P.D., 2010). Следствием этого является выход цитоплазматических ферментов, к которым относятся и трансаминазы, в межклеточное пространство, откуда они поступают в кровь, где активность их резко возрастает. Кроме того, отмечается резкое снижение концентрации глюкозы в сыворотке крови животных, что является следствием повышенных затрат энергии на компенсацию деструктивно-дегенеративных процессов в организме мышей.

Таблица 50 - Динамика биохимических показателей крови животных через 24 часа после начала эксперимента

Показатели	Ед. изм	Группа 1	Группа 5 (фон)	P
		М± м	М± м	
АЛТ	Е/л	936±106,3*	63,7±18,67	6,77*10 ⁻⁹
АСТ	Е/л	844±111,28*	195,4±87,09	5,63*10 ⁻¹⁰
Глюкоза	Ммоль/л	2,068±0,7*	6,17±1,99	0,02
Белок общий	г/л	54,38±6,83	58,06±3,04	0,27
Альбумин	г/л	29,88±3,7	32,56±1,69	0,30
Глобулин	г/л	24,5±5,25	25,5±2,35	0,25

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

При анализе концентрации глутатиона (рисунок 10) в печени опытных животных установлено, что через 24 часа после введения гепатотоксина, концентрация его увеличилась на 45 % по сравнению с интактными животными. Данные изменения концентрации глутатиона в гепатоцитах можно объяснить кратковременной повышенной экспрессией его в цитозоль гепатоцита в ответ на

введение тетрахлорметана (защитно-приспособительный механизм в ответ на воздействие ксенобиотика).

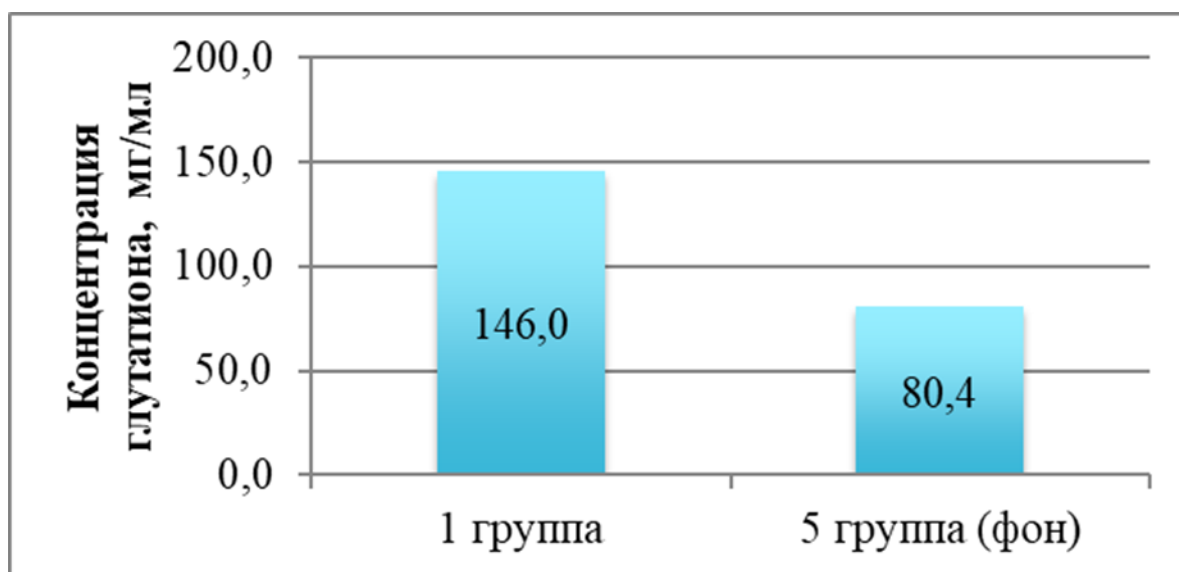


Рисунок 10 – Концентрация глутатиона в печени экспериментальных животных через 24 часа после начала эксперимента

При анализе гематологических показателей по окончании эксперимента, установлено достоверное снижение общего количества лейкоцитов у животных первой группы, которым вводили токсикант без проведения терапевтических мероприятий, по сравнению с контрольными мышами. Данный факт указывает на посттравматическое истощение иммунной системы. Вместе с этим количество лейкоцитов у животных 2 и 4 группы, которым в течение 6 дней вводили препарат «СилимаринМ» и силимарин конъюгированный с коллоидным золотом соответственно, было несколько выше чем в 5 (фоновой) группе животных.

Тогда как в третьей опытной группе мышей, которым в качестве гепатопротекторного средства вводили препарат силимарина конъюгированного с коллоидным селеном (СилимаринКС), гематологические показатели не отличаются от таковых у фоновых мышей. Что является следствием антиоксидантного влияния селена, который препятствует накоплению продуктов перекисного окисления липидов, способствуя восстановлению глутатиона, а также апоптозу клеточных элементов печени, которые утилизируются лейкоцитами. (рисунок 11).

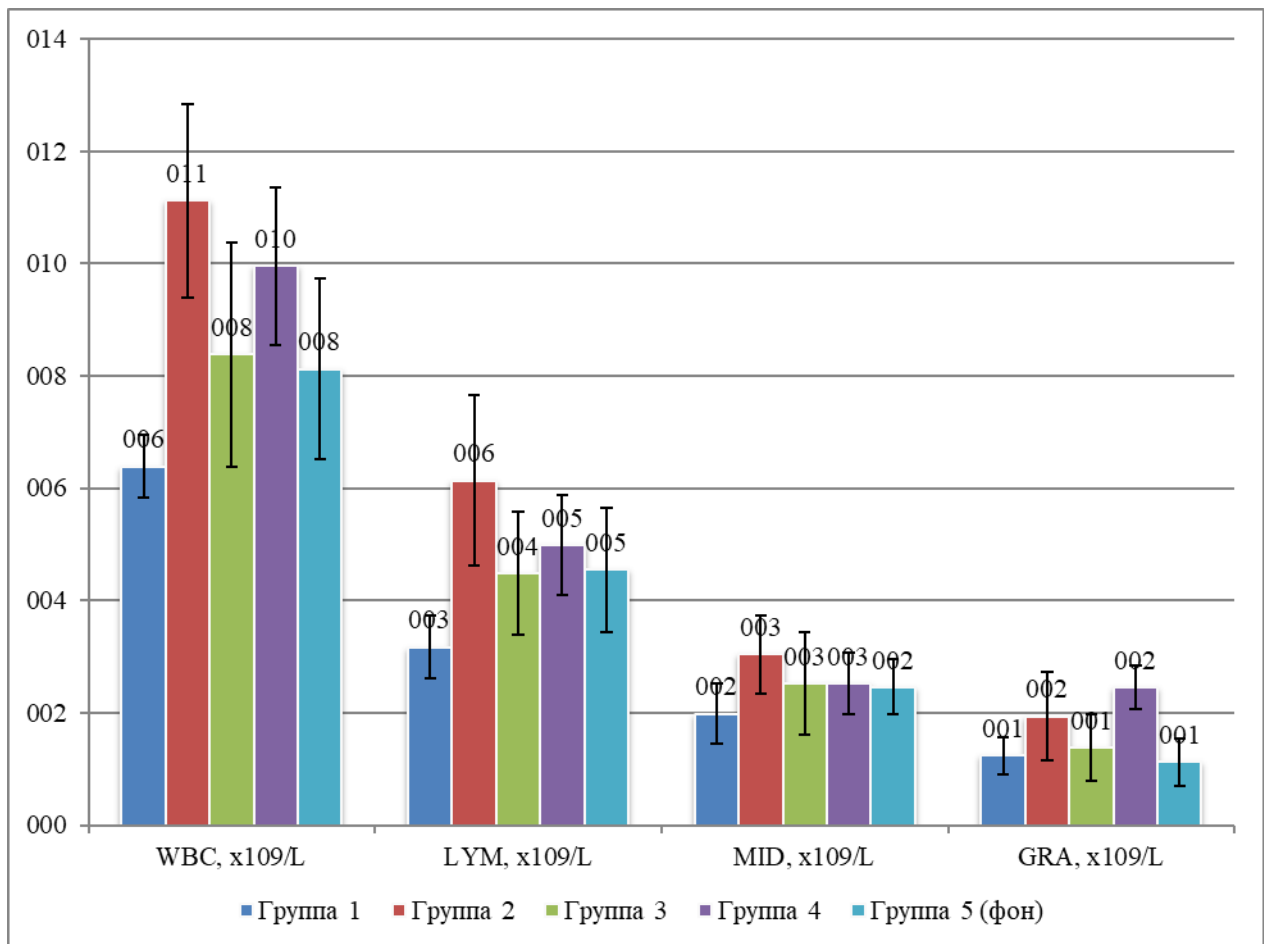


Рисунок 11 –Динамика изменений количества лейкоцитов периферической крови мышей

Анализ биохимических показателей сыворотки крови животных после окончания эксперимента (таблица 51) показал достоверное снижение индикаторных ферментов печени во всех группах животных. Данный факт указывает на восстановление структурно-функциональных свойств гепатоцитов, снижение воспалительно-деструктивных процессов в печени. Однако в четвертой группе мышей, которым проводили лечение препаратом силимарина конъюгированного с коллоидным золотом, активность данных ферментов была достоверно выше чем в контрольной группе. Вместе с этим в данной группе животных отмечаются более высокие показатели глюкозы, и альбуминов, а также относительно низкие показатели общего белка и глобулинов в сыворотке крови. Принимая во внимание тот факт, что трансаминазы обеспечивают взаимосвязь между обменом азотистых соединений и углеводов в организме животных, повышение индикаторных ферментов на фоне высоких концентраций альбуминов

и углеводов свидетельствуют о повышении энергетического метаболизма в организме животных. А понижение глобулинов может быть следствием увеличения моноцитарно-макрофагальной функции печени. Это является следствием применения препарата силимарина конъюгированного с коллоидным золотом.

В третьей опытной группе животных, которым применяли с терапевтической целью силимарин конъюгированный с коллоидным селеном, отмечали достоверное повышение общего белка и его фракций, относительно фоновых животных, что может быть следствием синергизма силимарина и селена, способствующих повышению компенсаторных факторов организма на действие ксенобиотика.

Вместе с этим у животных первой опытной группы отмечаются достоверно более низкие показатели альбуминов, при завышенных концентрациях глобулиновых фракций белка относительно контрольных животных. Данные изменения указывают на снижение альбуминсинтезирующей функции печени в организме животных на фоне применения ксенобиотика, а повышение глобулиновых фракций является следствием выброса в кровь белков острой фазы воспаления, что и указывает на наличие воспалительно-деструктивных процессов в паренхиме печени.

Снижение общего белка и альбуминов отмечается и во второй опытной группе мышей, которым с терапевтической целью назначали препарат «СилимаринМ». Это может быть следствием повышенных затрат энергии на восстановление функциональной активности гепатоцитов поврежденных действием ксенобиотика.

Таблица 51 - Биохимические показатели сыворотки крови мышей

Показатели	АЛТ, Е/л	АСТ, Е/л	Глюкоза, ммоль/л	Белок общий, г/л	Альбумин, г/л	Глобулин, г/л
Группа 1	64,5±2,0	205±47	5,3±1,6	64,9±6	20,2±2*	44,7±5*
P	0,71	0,12	0,12	0,51	0,003	0,01
Группа 2	60,3±1,5	206,8±53	5,4±1,47	56,9±3,6*	24,8±4,03*	32,1±5
P	0,95	0,12	0,1	0,0005	0,0009	0,33
Группа 3	49,4±2,9	173,4±33	6,7±3,73	95,8±25*	52,5±14,5*	43,2±13*
P	0,35	0,75	0,99	0,001	0,0003	0,04
Группа 4	90,4±13*	248±62*	9,5±1,48*	56±5,29*	37,2±3,3	18,8±4*
P	0,04	0,007	0,002	0,0008	0,01	0,001
Группа 5 (фон)	61,6±2,7	172,9±4	6,5±1,49	67,2±5,1	32,7±3,2	34,5±3,8

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

При оценке массы печени животных (Рисунок 12) по окончанию эксперимента отмечается положительная динамика изменений коэффициента массы печени во всех опытных группах животных.

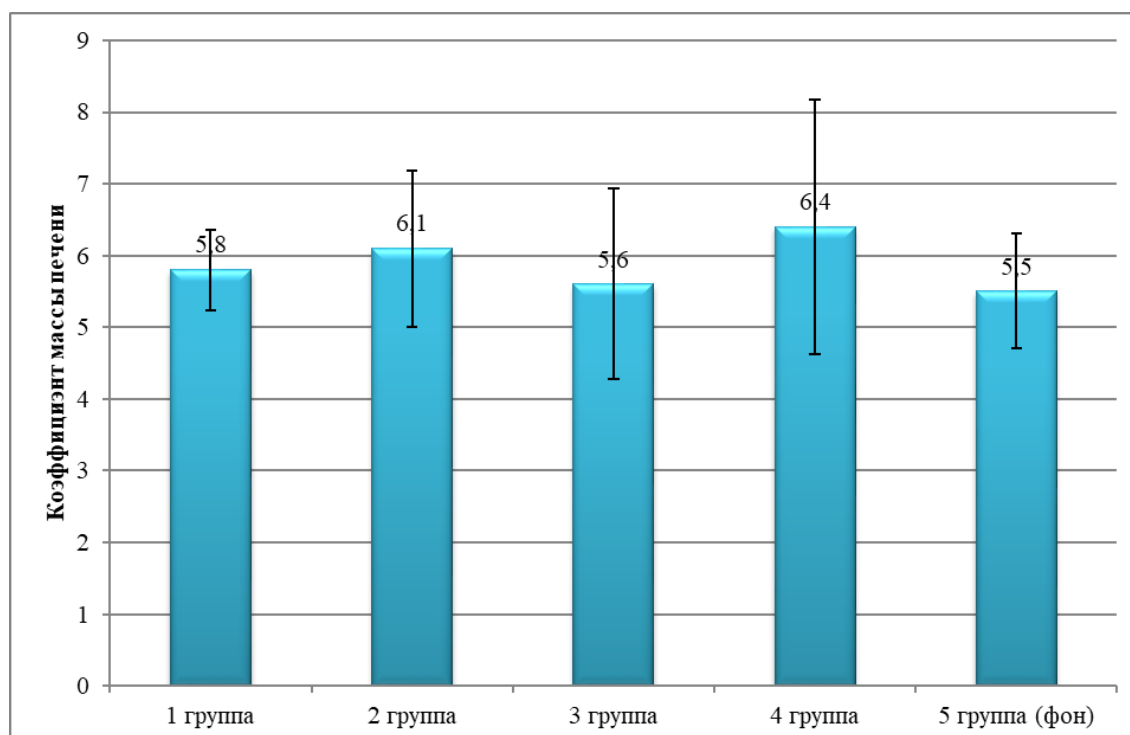


Рисунок 12 - Коэффициенты массы печени мышей

При анализе концентрации глутатиона в печени опытных животных после завершения эксперимента концентрация глутатиона (рисунок 13) резко снижается

у животных, которым лечение не применялось. Данный факт указывает на закономерное истощение глутатиона в ответ на окислительный стресс, вызванный введением гепатотоксина. Вместе с этим, в группах мышей которым применяли препараты силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) концентрация глутатиона была достоверно выше, чем в первой группе и находилась на одном уровне с интактными животными. Это объясняется тем, что силибинин входящий в состав препаратов обладает ярко выраженными антиоксидантными свойствами, что препятствует истощению глутатиона в гепатоцитах в ответ на воздействие ксенобиотика.

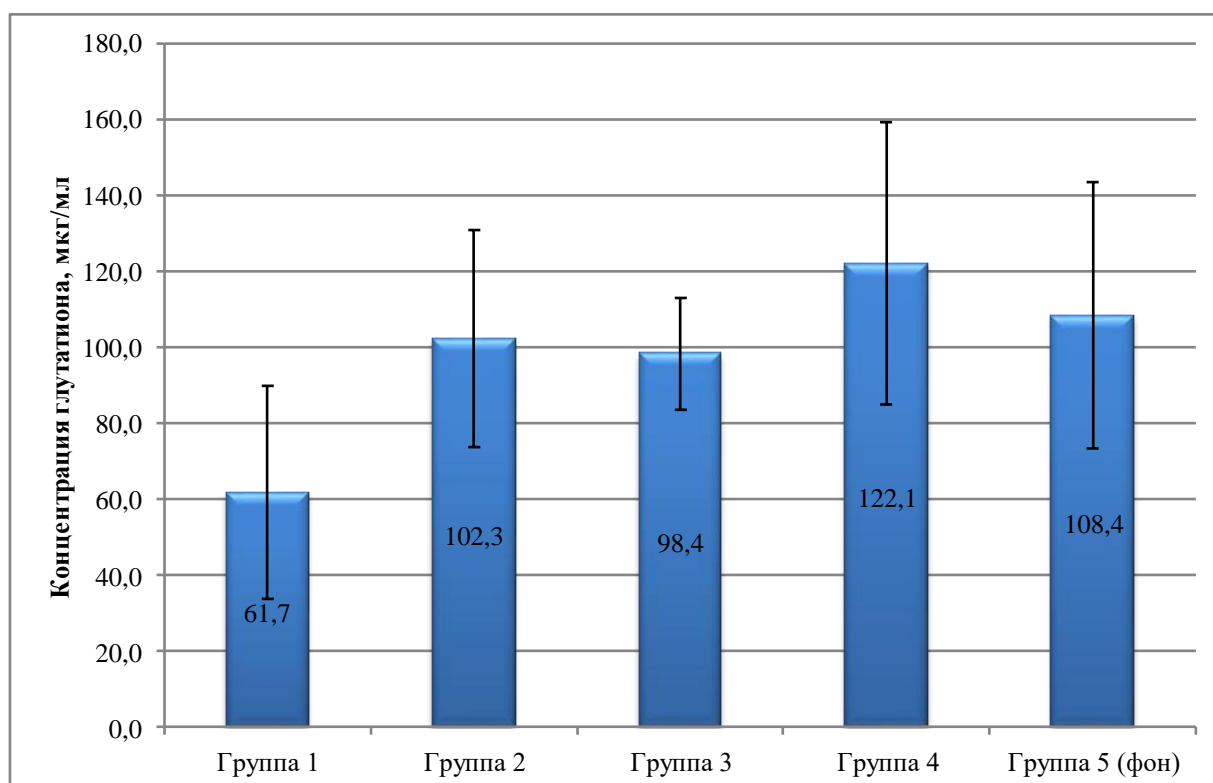


Рисунок 13 - Концентрация глутатиона в печени мышей

При анализе гистологической картины печени первой группы мышей с интоксикацией тетрахлорметаном (рисунок 14) наблюдаются множественные нарушения структуры ткани печени: дескомплексация печеночных балок, гидропическая дистрофия гепатоцитов, очаговые некрозы, острая венозная гиперемия, периваскулярные инфильтраты гранулоцитами.

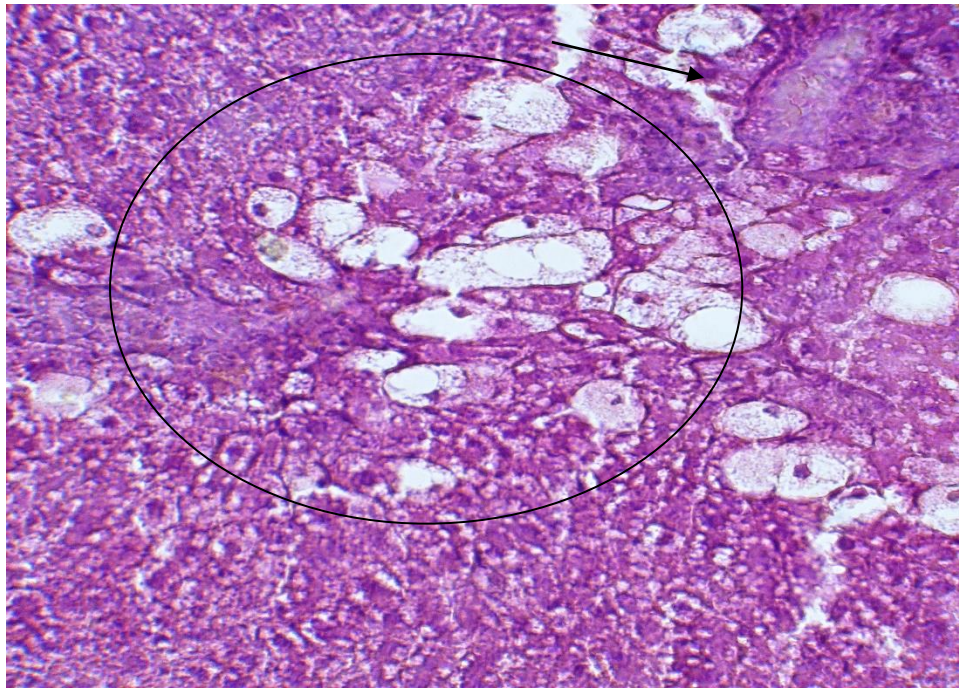


Рисунок 14 - Печень мыши. Первая группа. Очаговая гидропическая дистрофия гепатоцитов. Очаговые некрозы. ГЭ x 300

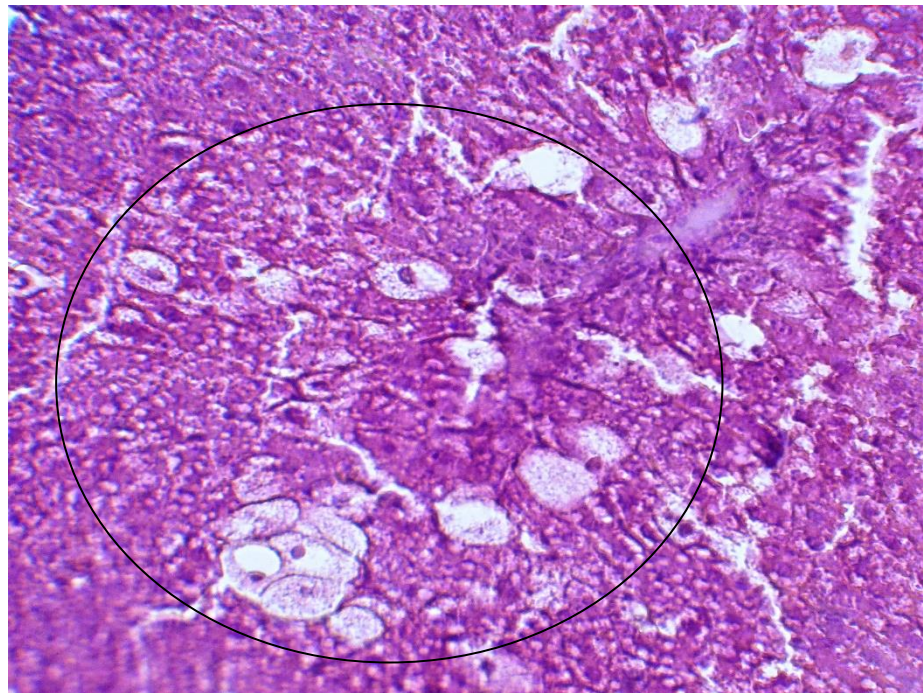


Рисунок 15 - Печень мыши. Первая группа. Балочная структура нарушена, очаговая гидропическая дистрофия. ГЭ x 300

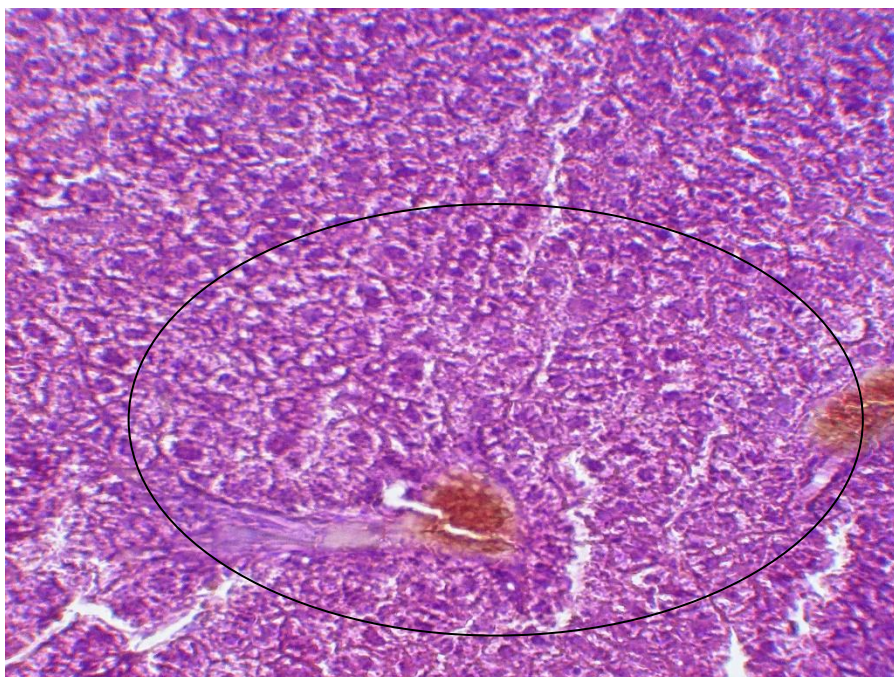


Рисунок 16 - Печень мыши. Первая группа. Зернистая дистрофия. Балочная структура нарушена, гиперемия кровеносных сосудов. Периваскулярные инфильтраты из полиморфноядерных лейкоцитов. ГЭ x 300

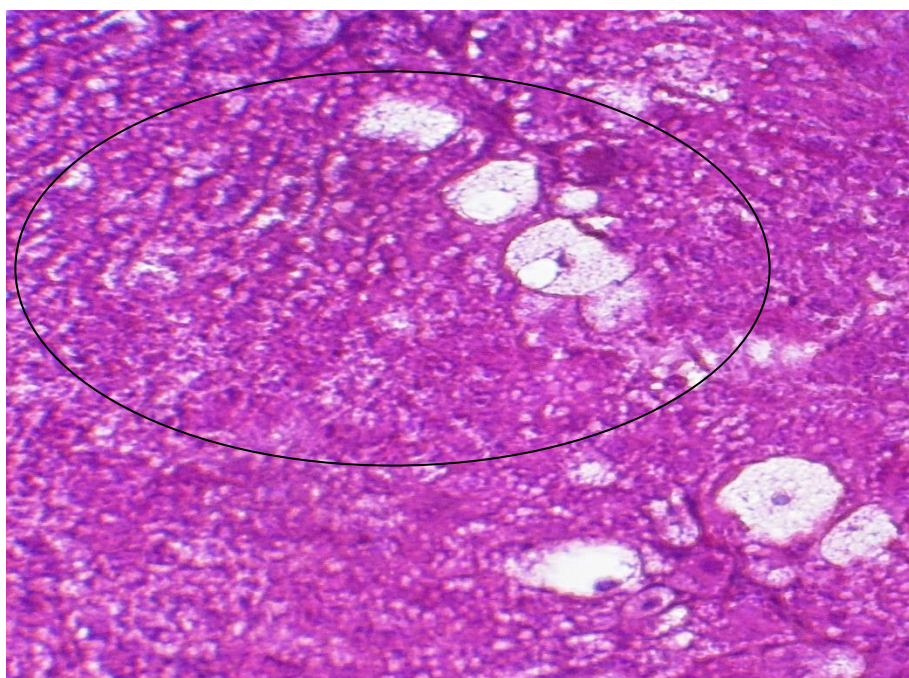


Рисунок 17 - Печень мыши. Первая группа. Очаговая гидропическая дистрофия. Балочная структура нарушена. ГЭ x 300

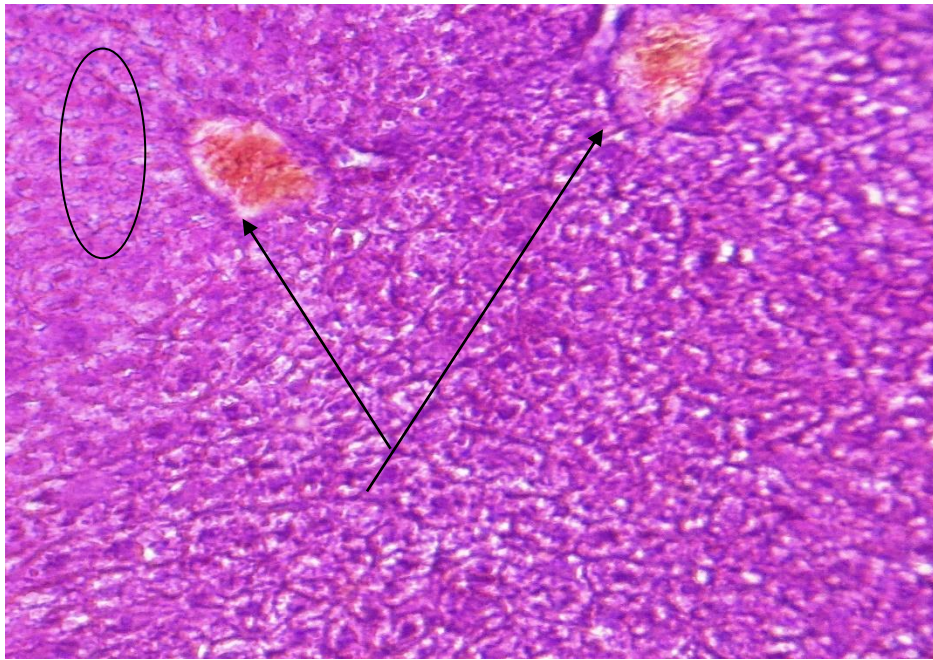


Рисунок 18 - Печень мыши. Первая группа. Гиперемия кровеносных сосудов. Зернистая дистрофия. Балочная структура нарушена. ГЭ x 300

При гистологическом исследовании ткани печени второй группы опытной мышью, которым на фоне тетрахлорметановой интоксикации назначали препарат СилимаринМ (Рисунок 19) было выявлено, что структура долек в значительной мере восстановлена, балочная структура сохранена. Однако наблюдается переполнение кровеносных сосудов кровью, инфильтрация периваскулярного пространства лимфоидными клетками.

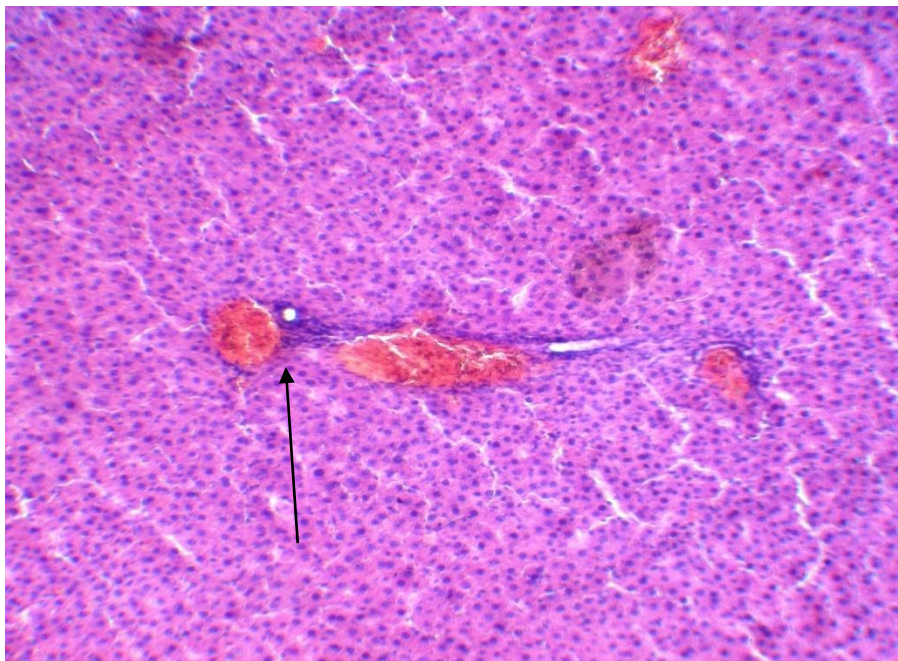


Рисунок 19 - Печень мыши. Вторая группа. Балочная структура сохранена, гиперемия сосудов, зернистая дистрофия, периваскулярная инфильтрация гранулоцитами. ГЭ x 150

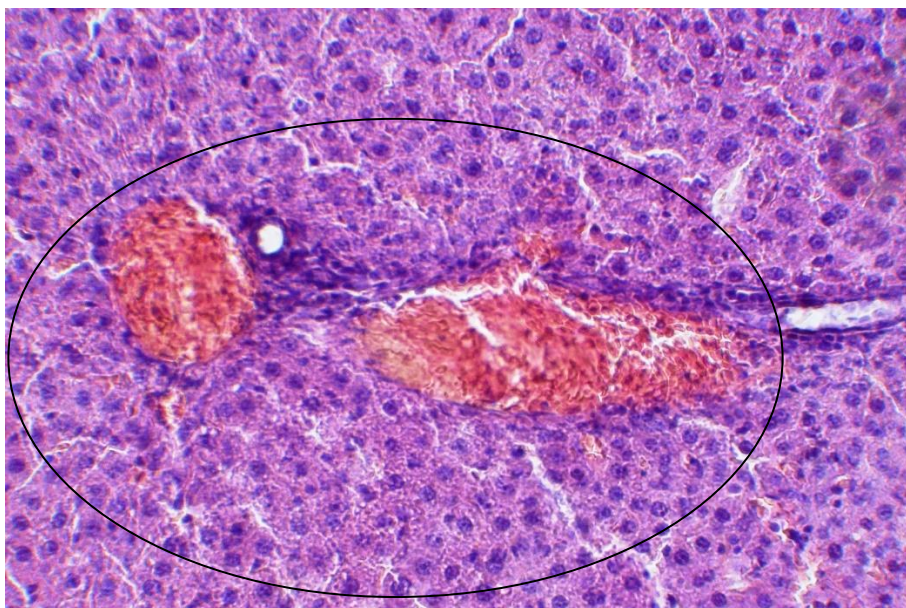


Рисунок 20 - Печень мыши. Вторая группа. Деталь к Рисунку 19. ГЭ x 300

Гистологическая картина печени в третьей группе мышей, которым на фоне интоксикации применяли препарат СилимаринКС (Рисунок 21) характеризуется умеренно выраженной гиперемией кровеносных сосудов, незначительным нарушением балочной структуры ткани, ослаблением тинкториальных свойств, очаговые некрозы гепатоцитов и наличием очагов зернистой дистрофии периваскулярной локализации



Рисунок 21 - Печень мыши. Третья группа. Гиперемия, очаговые лимфоидные инфильтраты, кариопикноз, зернистая дистрофия гепатоцитов. ГЭ x 150

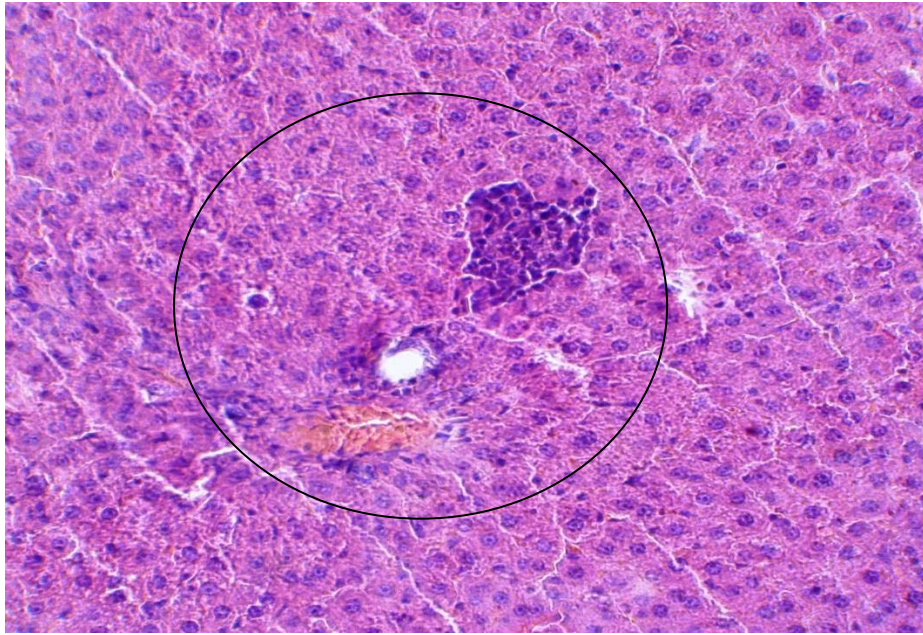


Рисунок 22 - Печень мыши. Третья группа. Деталь к Рисунку 21. ГЭ x 300

Гистологическая картина печени в четвертой группе мышей, которым на фоне интоксикации применяли препарат СилимаринКЗ (Рисунок 21) характеризуется выраженной гиперемией кровеносных сосудов, незначительным нарушением балочной структуры ткани, ослаблением тинкториальных свойств, очаговые некрозы гепатоцитов, периваскулярной инфильтрацией полиморфноядерными лейкоцитами и наличием очагов зернистой дистрофии.



Рисунок 23 - Печень мыши. Четвертая группа. Гиперемия, периваскулярные лимфоидные скопления, эритроциты между клетками печени, очаговый некроз гепатоцитов, зернистая дистрофия гепатоцитов. ГЭ x 150

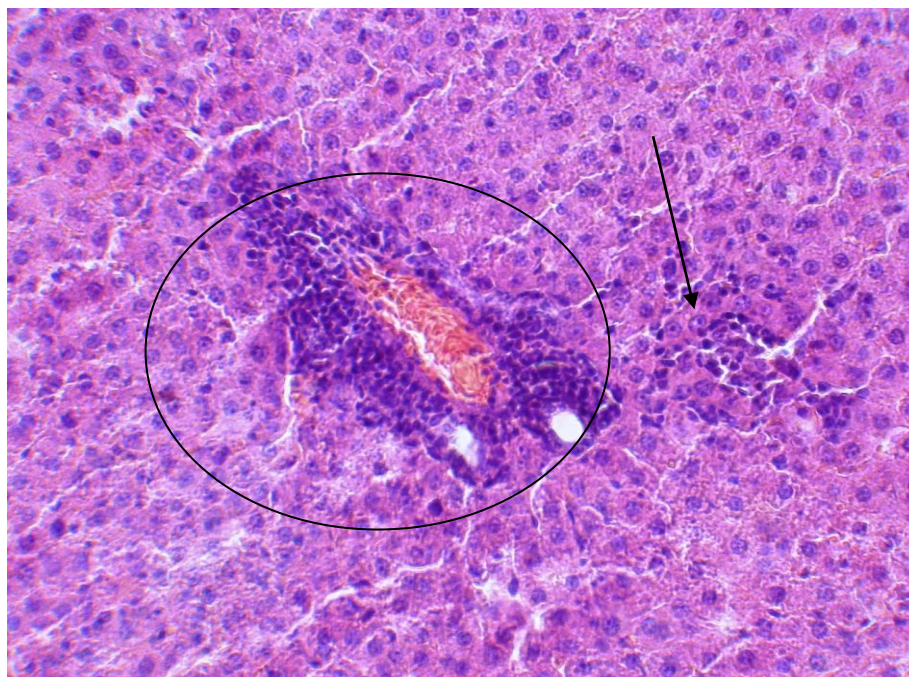


Рисунок 24 - Печень мыши. Четвертая группа. Деталь к Рисунку 23. ГЭ х 300

Таким образом, проведенные исследования подтвердили гепатопротекторные свойства новых лекарственных гепатопротекторных препаратов на основе коллоидных частиц и полимерных матриц при острой патологии печени вызванной токсическим действием тетрахлорметана.

3.2.6 Терапевтическая эффективность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц в общей схеме лечения животных с заболеваниями печени

3.2.6.1 Терапевтическая эффективность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц при жировой дистрофии печени у коров

Целью настоящих исследований явилось изучение терапевтической эффективности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц при гепатозе у коров в условиях животноводческого хозяйства КФХ «Давыдов», Петровского района Саратовской области.

Это было слепое исследование клинической эффективности с наличием контрольной группы при использовании схемы рандомизированных блоков, основанных на физиологическом состоянии коров. Исследования осуществлялись

согласно утвержденному письменному протоколу и в соответствии со Стандартными операционными процедурами исследователя (СОП).

Объектом исследования служили разработанные нами препараты:

- водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ);
- силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС);
- силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ).

Предметом исследования были коровы 2-3 периода лактации, которых идентифицировали и оценивали в отношении переменной исследования на индивидуальной основе.

Все животные подвергались комплексному обследованию, которое включало в себя клиническое и лабораторное исследование.

Исходя из полученных в ходе вышеуказанных исследований результатов, проводили формирование групп по сходным физиологическим показателям.

В результате проведения диспансерного обследования поголовья в конце зимне-стойлового периода у 63 коров 2 – 3 периода лактации были выявлены признаки нарушения функциональной активности печени.

Коров с признаками гепатоза разделили на 4 группы 3 опытных и 1 контрольную. Критериями включения в группу явились характерные признаки дистрофического поражения печени:

Угнетение, снижение аппетита, нарушение процесса жвачки, гипотония преджелудков, увеличение задней перкуторной границы печени. У некоторых животных отмечалась болезненность в области печени при пальпации. Волосяной покров матовый, взъерошен. У некоторых животных отмечали диспепсические расстройства.

В сыворотке крови (таблица 53) установлено повышение цитолитических ферментов (аланин- и аспартатаминотрансферазы), гамма глутамилтрансферазы, снижение альбуминов, повышение глобулиновых фракций белка. Повышение билирубина, и его фракций, холестерина. Снижение глюкозы.

При анализе морфологического состава крови (таблица 54) установлено, что количество эритроцитов и гемоглобина находится на нижней границе нормы при

этом снижен средний объем эритроцитов и гематокритный показатель.

При ветеринарно-санитарной экспертизе внутренних органов, выбракованных коров, ввиду потери ими молочной продуктивности, было выявлено жировое перерождение печени (жировая дистрофия), соответствующее патологоанатомической картине гепатоза (рисунок 25): увеличение органа, дряблость, глинистый цвет. При этом имело место генерализованное ожирение в подкожной клетчатке, в плевральной и перитонеальной полостях, сердце и почках. Печень при ожирении имела увеличенные размеры, желтый цвет, округлые края.



Рисунок 25 – Жировая дистрофия печени при гепатозе у коровы, выбракованной в связи с потерей молочной продуктивности

Гистологическими исследованиями выявлены признаки ярко выраженной жировой дистрофии, при окраске суданом черным «В», как в цитоплазме клеток, так и между гепатоцитами наблюдается большое количество мелких жировых капель (рисунок 26, 27). При окраске гематоксисилин-эозином имеет место большое количество вакуолей различного размера, балочная структура нарушена. Границы гепатоцитов нечеткие (рисунок 28).



Рисунок 26 - Гистологическая картина печени коровы выбракованной в связи с потерей молочной продуктивности. Окраска Суданом черным «В». Увеличение X100.



Рисунок 27 - Гистологическая картина печени коровы, выбракованной в связи с потерей молочной продуктивности. Окраска Суданом черным «В». Увеличение X200.

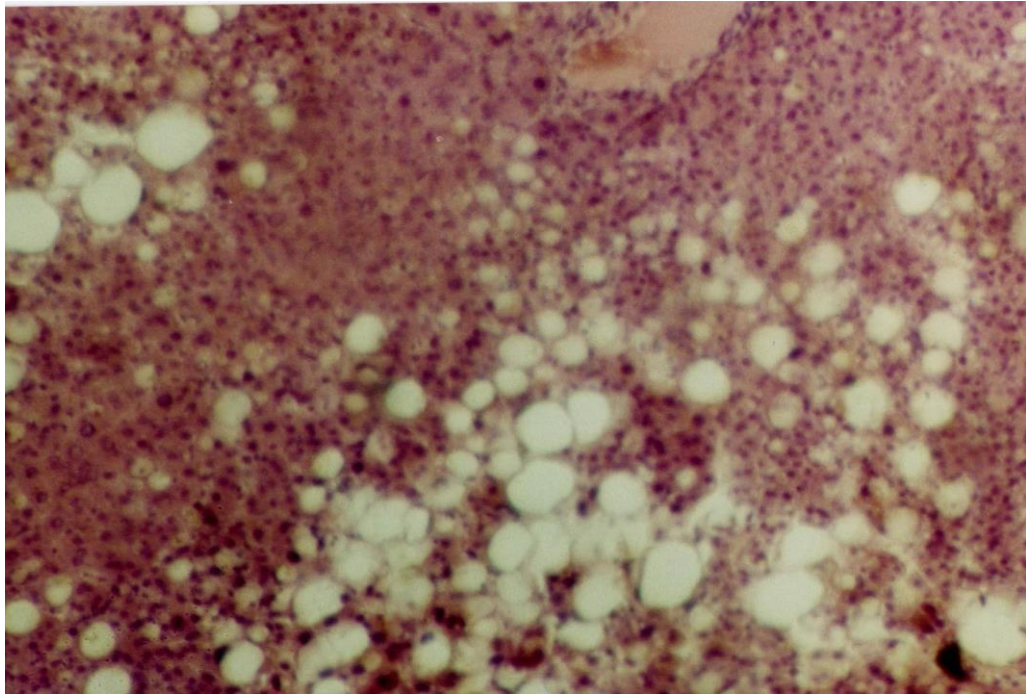


Рисунок 28 - Гистологическая картина печени коровы, выбракованной в связи с потерей молочной продуктивности. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение X100.

После постановки диагноза животных разделили на 4 группы и назначили соответствующее лечение (таблица 52).

Животные во всех опытных группах получали одинаковую базовую терапию, которая включала в себя:

1. Диетическое кормление: исключение из рациона силоса кукурузного и подсолнечного жмыха плохого качества. А также дача сена хорошего качества, концентрированных кормов и корнеклубнеплодов.;

2. Внутривенные вливания раствора Рингера-локка в дозе 1 -1,5 л на животное с аскарбиновой кислотой (5% - 2мл на одну голову) для снятия интоксикации;

3. В качестве гепатопротекторного средства животным 1 первой контрольной группы назначали коммерческий препарат «Антитокс», согласно инструкции по применению в дозе 20,0-40,0 мл, на животного в течение 6 дней подряд.

4. В опытных группах животных в качестве гепатопротекторных средств применяли разработанные нами препараты силимарина на основе коллоидных

частиц (селена и золота) и полимерных матриц:

- Животным 2 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 6 дней вводили водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме

- Животным 3 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 6 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

- Животным 4 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 6 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме.

Таблица 52 - Дизайн эксперимента по определению терапевтической эффективности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц

Группа	Терапевтическое средство	Способ применения	Курс (дни)	Общее количество животных
1	Антитокс (препарат сравнения)	Внутримышечно	1 раз в день, 7 дней	16
2	«Мицелярный раствор силимарина» (испытуемый препарат)	Внутримышечно	1 раз в день, 7 дней	16
3	«Коллоидный селен и силимарин» (испытуемый препарат)	Внутримышечно	1 раз в день, 7 дней	16
4	«Коллоидное золото и силимарин» (испытуемый препарат)	Внутримышечно	1 раз в день, 7 дней	15

Улучшение клинического состояния животных наблюдали на 5-7 день после назначения лечебных мероприятий.

Общеклинические показатели не имели выраженных отличий между опытными и контрольной группами животных.

Вместе с этим при анализе гематологических показателей (таблица 52) через 7 суток после отмены гепатопротекторов установлена положительная динамика увеличения гемоглобина и эритроцитов во всех группах животных. Хотя

показатели оставались ниже фоновых значений. К 30 суткам эксперимента гематологические показатели в опытных группах коров достигали фоновых значений.

Таблица 53 - Гематологические показатели крови коров

Группы	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV
	x10 ⁹ /L	x10 ¹² /L	g/L	%	fl
До начала эксперимента					
Норма	4-12	5,0-10	80-150	30,1-50,1	40-60
1 контрольная	9,2±2,21	6,5±0,49*	82,7±13,56	25,3±4,42*	35,8±2,09*
2 опытная	11±2,06	7,4±0,65*	85,5±7,38	26±1,95*	36,1±1,34*
3 опытная	10,9±1,5	6,9±1,24*	76,5±15,64	23,3±5,11*	33,6±1,88*
4 опытная	9,4±2,35	7,4±1,02*	83,3±10,76	23,9±3,5*	34,7±2,21*
Фон	9,3±0,79	8,1±0,81	118,3±12,61	35,8±1,7	42,8±2,17
Через 14 суток					
1 контрольная	8±1,7	8,2±0,73	104,3±13,63	32,2±4,83	39,3±6,36
2 опытная	9,4±2,35	8,4±1,02	103,3±10,76	31,9±3,5	38±4,2
3 опытная	8±1,7	8,2±0,73	104,3±13,63	32,2±4,83	39,3±6,36
4 опытная	10,3±1,25	7,3±0,69	84,8±10,21*	33,7±3,06	45±3,59*
Фон	9,5±1,84	8,6±0,54	116,2±8,02	35,5±1,87	41,4±1,96
Через 30 дней					
1 контрольная	9,9±1,12	8,3±0,75	111,4±5,14	38±1,7	43,5±3,04
2 опытная	9,2±1,44	8,6±0,41	111,3±5,32	37,8±1,73	42,8±2,76
3 опытная	12,1±4,54	9±0,58	115,9±6,95	38,2±2,48	43,9±2,68
4 опытная	9,8±1,57	8,4±0,84	117±4,75	39,3±3,48	41,9±2,18
Фон	9,4±1,34	9,1±0,45	122,1±6,01	40,3±1,7	44,5±2,06

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных (P ≤ 0,05 при t критическом 2,10)

В результате биохимических исследований сыворотки крови (Таблица 54) установлено незначительное повышение цитолитических ферментов печени АСТ И АЛТ выше референсных значений, что наряду с повышением активности гаммаглутамилтрансферазы указывает на нарушение порозности клеточных мембран гепатоцитов. А повышение щелочной фосфатазы указывает на сужение желчных протоков, вследствие чего компоненты желчи попадают в кровеносное русло. Кроме того, установлено снижение альбуминов в сыворотке крови. Что говорит о нарушении альбуминсинтезирующей ее функции. И повышение глобулиновых фракций белка. Также у больных животных отмечали достоверное

снижение глюкозы в сыворотке крови, что также указывает на нарушение функциональной активности вследствие особенности углеводного обмена у крупного рогатого скота. Это объясняется тем, что наряду с повышенными энергетическими затратами на компенсацию патологических процессов в организме животного, нарушается и функция глюконеогенеза в гепатоцитах, за счет которого обеспечивается основная потребность в глюкозе.

Через 14 суток после начала эксперимента во всех опытных группах животных отмечалась положительная динамика биохимических показателей сыворотки крови (таблица 55). Так отмечается снижение активности трансаминаз в сыворотке крови, относительно первоначальных значений, глутамилтранспептизы и щелочной фосфатазы.

Отмечается нормализация белкового метаболизма. Так отмечается достоверное повышение концентрации сывороточного альбумина, что свидетельствует о нормализации альбуминсинтезирующей функции печени. Концентрация сывороточной глюкозы во всех группах животных достигает фоновых значений. Отмечается положительная динамика пигментного обмена. Общий билирубин достигает референсных значений, для данного вида животных, однако данный показатель достоверно выше, чем у клинически здоровых животных.

К 30 суткам эксперимента во всех опытных группах животных биохимические показатели сыворотки крови достигли значений фоновой значений и достоверно от них не отличались (таблица 56).

Таблица 54 - Биохимические показатели сыворотки крови коров до лечения

Показатели	Ед. изм.	Норма	1 контрольная (n=16)	2 опытная (n=16)	3 опытная (n=16)	4 опытная (n=15)	Фон (n=79)
АЛТ	Е/л	6,9 – 35	45,1±3,52*	47,2±4,33*	46,2±4,47*	50,1±2,85*	18,2±2,51
АСТ	Е/л	45-110	122±5,66*	115,2±9,87*	125,4±8,96*	131,9±8,05*	76,6±3,77
ГГТ	Е/л	4,9-26	31,6±2,28*	32,5±1,71*	32,2±2,17*	28,3±2,37*	18,4±3,97
Щелочная фосфатаза	Е/л	18-153	282,8±55,13*	267,1±37,5*	268,9±68,4*	245±10,91*	113±10,9
Биллирубин общий	мкмоль/л	0,7-14	14,56±1,34*	14,94±1,03*	14,31±1,21*	15,57±1,29*	6,57±0,56
Биллирубин прямой	мкмоль/л	0,1-0,7	2,53±0,23*	2,56±0,26*	2,5±0,19*	2,58±0,23*	0,52±0,03
Глюкоза	ммоль/л	2,3-4,1	1,37±0,1*	1,29±0,12*	1,4±0,08*	1,31±0,12*	2,54±0,21
Холестерин	ммоль/л	1,6-5,0	3,31±0,24	3,48±0,27	3,35±0,36	3,54±0,31	3,36±0,34
Белок общий	г/л	62-82	61,83±5,39	62±4,64	59,6±4,72	61,9±5,5	67,55±5,86
Альбумин	г/л	28-39	19,52±1,18*	19,77±1,48*	20,35±2,03*	20,09±1,44*	29,04±2,37
Глобулин	г/л	29-49	48,26±4,64*	45,3±3,8*	48,13±4,75*	48,65±4,73*	41,33±3,01
Железо	мкмоль/л	20-36	26,08±0,78	26,17±1,31	26,46±1,67	25,99±1,26	26,46±1,69
ОЖСС	мкмоль/л		62,18±5,85	62,72±4,62	63,05±4,17	59,45±4,96	59,85±5,15

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

Таблица 55 - Биохимические показатели сыворотки крови коров через 14 суток

Показатели	Ед. изм.	Норма	1 контрольная (n=16)	2 опытная (n=16)	3 опытная (n=16)	4 опытная (n=15)	Фон (n=79)
АЛТ	Е/л	6,9 – 35	37,95±2,71*	38,23±4,38*	37,05±3,77*	38,4±3,38*	18,2±2,51
АСТ	Е/л	45-110	106,75±6,57*	109,67±11,09*	109,89±8,52*	114,26±10,28*	76,6±3,77
ГГТ	Е/л	4,9-26	26,67±2,36*	26,57±2,45*	27,32±1,2*	27,14±2,16*	18,4±3,97
Щелочная фосфатаза	Е/л	18-153	190,3±16,2*	195,26±18,77*	190,74±16*	200,44±18,07*	113±10,9
Биллирубин общий	мкмоль/л	0,7-14	9,74±1,06*	11,16±0,82*	10,01±0,96*	11,79±1,08*	6,57±0,56
Биллирубин прямой	мкмоль/л	0,1-0,7	1,52±0,12	1,58±0,16	1,39±0,1	1,7±0,14	0,52±0,03
Глюкоза	ммоль/л	2,3-4,1	2,67±0,25	2,63±0,23	2,84±0,3	2,56±0,18	2,54±0,21
Холестерин	ммоль/л	1,6-5,0	3,59±0,32	3,49±0,34	3,31±0,31	3,62±0,38	3,36±0,34
Белок общий	г/л	62-82	65,31±5,59	62,86±3,85	66,82±6,74	61,59±3,52	67,55±5,86
Альбумин	г/л	28-39	25,83±1,81	24,04±2,11	25,42±2,47	23,77±1,89	29,04±2,37
Глобулин	г/л	29-49	39±4,58	39,08±6,05	40,21±5,55	38,92±5,62	41,33±3,01
Железо	мкмоль/л	20-36	25,23±2,12	25,54±2,16	24,82±2,05	26,13±2,78	26,46±1,69
ОЖСС	мкмоль/л		62,17±4,16	62,94±5,74	62,88±5,47	60,17±5,56	59,85±5,15

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных (P ≤ 0,05 при t критическом 2,10)

Таблица 56 - Биохимические показатели сыворотки крови коров через 30 дней

Показатели	Ед. изм.	Норма	1 контрольная (n=16)	2 опытная (n=16)	3 опытная (n=16)	4 опытная (n=15)	Фон (n=79)
АЛТ	Е/л	6,9 – 35	16,85±1,64	17,51±1,7	16,35±1,63	18,72±1,97	18,2±2,51
АСТ	Е/л	45-110	79,65±7,26	82,58±6,8	80,54±9,45	83,23±6,64	76,6±3,77
ГГТ	Е/л	4,9-26	19,58±1,59	20,86±2,2	19,37±2,37	21,06±1,99	18,4±3,97
Щелочная фосфатаза	Е/л	18-153	102,74±9,76	99,64±8,8	101,66±10	101,17±8	113±10,9
Биллирубин общий	мкмоль/л	0,7-14	6,97±0,62	7,24±0,78	6,7±0,51	7,31±0,85	6,57±0,56
Биллирубин прямой	мкмоль/л	0,1-0,7	0,57±0,08	0,73±0,07	0,47±0,04	0,73±0,07	0,52±0,03
Глюкоза	ммоль/л	2,3-4,1	2,71±0,2	2,56±0,29	2,58±0,2	2,58±0,26	2,54±0,21
Холестерин	ммоль/л	1,6-5,0	3,71±0,41	3,65±0,39	3,53±0,36	3,6±0,35	3,36±0,34
Белок общий	г/л	62-82	64,94±6,41	63,08±7,2	68,83±6,89	68,26±4,6	67,55±5,86
Альбумин	г/л	28-39	28,82±3,05	30,81±3,02	28,6±3,77	29,84±3,1	29,04±2,37
Глобулин	г/л	29-49	36,47±5,28	33,48±5,8*	40,73±5,09	39,49±3,9	41,33±3,01
Железо	мкмоль/л	20-36	26,13±2,18	27,18±1,8	25,49±2,96	26,09±2,7	26,46±1,69
ОЖСС	мкмоль/л		62,13±5,01	58,49±5,2	62,94±7,05	59,99±5,9	59,85±5,15

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных (P ≤ 0,05 при t критическом 2,10)

Учитывая тот факт, что при исследовании морфологического состава крови у животных опытных групп на фоне гепатоза отмечалась микроцитарная анемия, которая как известно по большей части связана с дефицитом железа. Вместе с тем концентрация последнего на протяжении всего опыта в сыворотке крови опытных животных находилась в пределах физиологических границ и не отличалась от клинически здоровых животных.

Нами проведены исследования по изучению динамики сывороточного ферритина (таблица 57).

Таблица 57 - Концентрация ферритина в сыворотке крови животных, мкг/мл

Сроки исследований	1 контрольная (n=16)	2 опытная (n=16)	3 опытная (n=16)	4 опытная (n=15)	Фон (n=79)
До лечения	2,69±0,21*	2,51±0,26*	2,74±0,28*	2,75±0,27*	1,54±0,13
Через 14 суток	2,06±0,17*	2,19±0,13*	1,63±0,09**	2,08±0,14*	1,55±0,12
Через 30 суток	1,7±0,13	1,84±0,13	1,59±0,11	1,82±0,16	1,55±0,08

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10),

В ходе исследования установлено достоверное повышение ферритина (рисунок 29) в сыворотке крови подопытных животных выше фоновых значений. Что может быть вызвано повышенным его синтезом вследствие накопления в печени липидов низкой плотности, а также как результат реакции острой фазы, где ферритин играет важную роль в ингибировании внеклеточных протеаз, модуляции функции иммунных клеток, нейтрализации и очищении от вредоносных веществ.

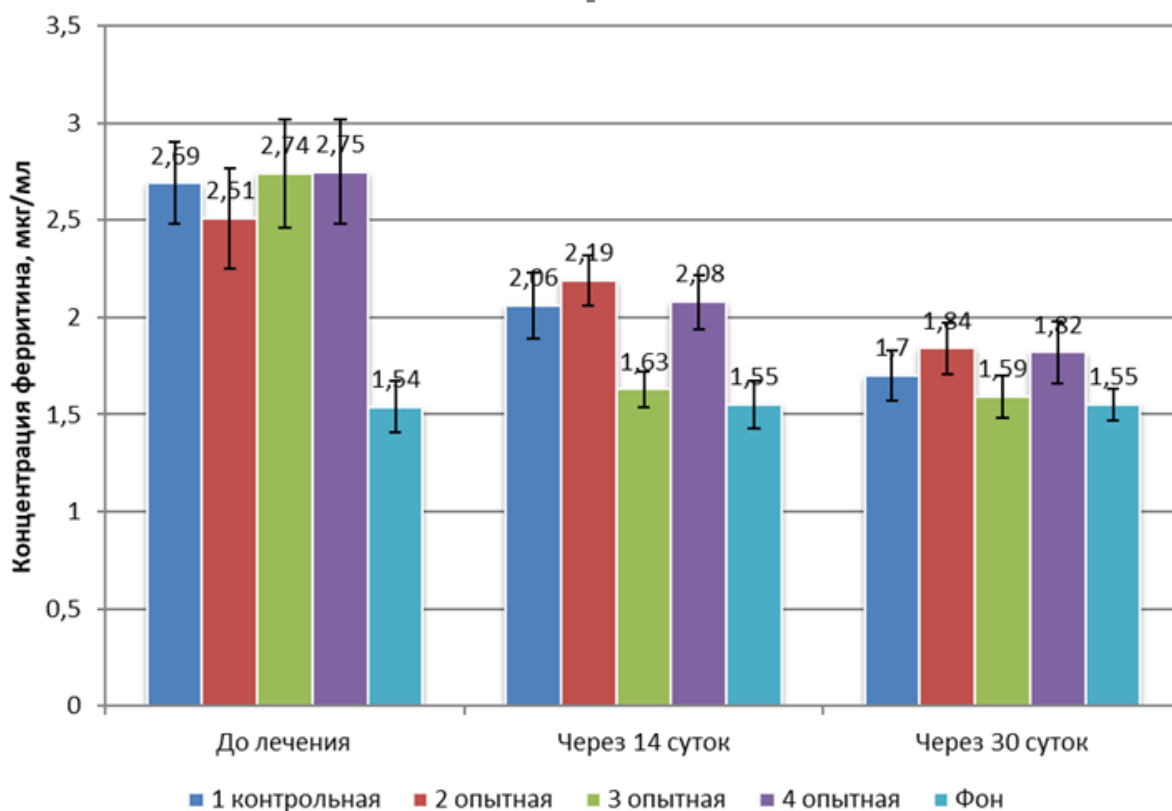


Рисунок 29 – Динамика изменений концентрации ферритина в сыворотке крови коров

В результате проведения лечения уже к 14 дню наблюдается положительная динамика снижения ферритина в сыворотке крови всех групп животных. Однако, у животных 3 опытной группы который в качестве гепатопротекторного средства назначали силимарин с коллоидным селеном, данный показатель достиг значений клинически здоровых животных. Это может быть связано с включением селена в метаболический цикл, что способствовало усилению детоксикационной функции гепатоцитов.

К 30 суткам эксперимента концентрация ферритина во всех опытных группах животных не имела достоверных отличий от фоновых животных.

Учитывая тот факт, что патогенез, течение и исход патологий гепатобилиарной системы в значительной степени зависят от антиоксидантного статуса организма как совокупности про- и антиоксидантных процессов, нами были изучены некоторые показатели антиоксидантной системы крови (таблица 58).

В ходе определения концентрации малонового диальдегида установлено

достоверное его повышение во всех опытных группах к началу эксперимента, по сравнению с клинически здоровыми животными. Вместе с этим активность глутатионпероксидазы во всех группах животных не имела достоверных отличий от фоновых животных, что является следствием включения компенсаторных механизмов в организме животных. Через 14 дней после назначения терапевтических мероприятий наблюдалась положительная динамика снижения концентрации малонового диальдегида в крови всех групп животных. Однако в группе животных которым назначали лекарственное средство на основе силамарина с коллоидным селеном концентрация данного показателя была достоверно ниже чем в остальных опытных группах и не отличалась от клинически здоровых животных. В этой же группе животных возрастала и активность селен содержащего фермента глутатионпероксидазы. Что указывает на включение селена содержащегося в препарате в метаболический цикл антиоксидантной системы организма животных.

Таблица 58 - Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы защиты у коров

Сроки исследований	1 контрольная (n=16)	2 опытная (n=16)	3 опытная (n=16)	4 опытная (n=15)	Фон (n=79)
	МДА, нмоль/л				
До лечения	2,04±0,15*	2,15±0,16*	1,91±0,14*	2,15±0,14*	0,71±0,06
Через 14 суток	1,61±0,13*	1,65±0,13*	0,67±0,06**	1,57±0,12*	0,69±0,06
Через 30 суток	0,69±0,06	0,71±0,04	0,69±0,06	0,68±0,04	0,68±0,06
	Глутатионпероксидаза, мкмоль G-SH /л x мин				
До лечения	11,3±0,59	11,31±0,78	10,58±0,74	11,1±0,66	12,7±0,84
Через 14 суток	12,28±0,74	12,4±1,1	14,87±1,01*	12,1±0,8	12,64±0,89
Через 30 суток	12,29±0,83	12,48±0,87	13,75±0,88*	12,11±1,01	12,85±0,71

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10),

Таким образом, достоверно установлено, что парентеральное применение с терапевтической целью больным гепатозом коровам препаратов силмарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц приводит к восстановлению функциональной активности печени.

Вместе с этим, препарат силмарина на основе коллоидного селена наряду

ярко выраженными гепатопротекторными свойствами, проявил выраженное антиоксидантное действие, в результате чего активнее осуществляются регенеративные процессы и связывание токсических веществ.

3.2.6.2 Терапевтическая эффективность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц при лечении собак с острым вторичным гепатитом

Целью данного исследования явилось изучение терапевтической эффективности препаратов силимарина на основе наночастиц (селена и золота) и полимерных матриц при лечении собак с вторичным инвазионным гепатитом.

Предметом исследования была отдельная собака, которую идентифицировали, лечили и оценивали в отношении переменной исследования на индивидуальной основе.

Все животные подвергались комплексному обследованию, которое включало в себя клиническое и лабораторное исследование.

Исходя из полученных в ходе выше указанных исследований, проводили формирование групп по сходным клиническим признакам и физиологическим показателям.

В исследование были включены 48 собак с диагнозом острый вторичный (бабезиозный) гепатит (32 самца и 16 самок в возрасте от 8 мес., до 6 лет разных пород, живой массой от 1,0 до 17,0 кг) пришедшие на прием в ветеринарную клинику Доктор вет.

Критерием отбора в группу для исследований являлось наличие симптомов поражения гепатобилиарной системы и установленного на основании клинико-лабораторных исследований диагноза бабезиоз, гепатит.

После включения в исследование собак взвесили и сформировали по принципу аналогов 12 блоков по 4 животных в каждом. Последовательно основанных на весе тела, возрасте и клинических симптомах заболевания. Которых в произвольном порядке распределили в одну из 4 групп (таблица 59).

Таблица 59 - Дизайн эксперимента по изучению терапевтической эффективности препаратов силимарина на основе наночастиц (селена и золота) и полимерных матриц при лечении собак с вторичным инвазионным гепатитом

Лечебная группа	Схема лечения препарат	Способ применения	Объем, кратность, курс	Общее количество животных
1	Базовая терапия + Гепатоджект (препарат сравнения)	внутримышечно	2-5 мл, 1 раз в день, 7 дней	12
2	Базовая терапия + «Мицелярный раствор силимарина» (испытуемый препарат)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	12
3	Базовая терапия + «Коллоидный селен и силимарин» (испытуемый препарат)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	12
4	Базовая терапия + «Коллоидное золото и силимарин» (испытуемый препарат)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	12

Животные всех групп получали одинаковую базовую терапию по следующей схеме:

1. В качестве этиотропной терапии применяли антипротозойный препарата «Пиро-стоп» в дозе 0,05 мл/кг, подкожно в среднюю треть шеи, однократно;

3. Для снижения гипоксии тканей, нормализации коронарного кровообращения, в качестве антиаритмического, а также повышения энергетического баланса миокарда –Рибоксин в дозе 10 мг/кг, внутривенно, 1 раз в день 5 дней;

4. Для восстановления водного баланса, дезинтоксикации, поддержания плазменного объема - раствор NaCl 0,9 % в дозе 50 мл на животное, внутривенно капельно, кратность - 2 раза в день, курс – 3 - 10 дней;

5. Для регуляции углеводного обмена, нормализации проницаемости капилляров, и для поддержания процессов кроветворения и регенерации тканей, в качестве антиоксиданта - Аскорбиновая кислота 2 мг/кг на животное, внутривенно, кратность - 1 раз в день, курс – 3-10 дней;

6. Для улучшения процессов обмена веществ, антитоксической функции печени и работы сердца, для расширения кровеносных сосудов, усиление диуреза, повышения защитных сил организма животных - Глюкоза 40% в дозе 3-5 мл на животное, внутривенно, кратность – 2 раза в день, курс – 3- 10 дней;

Животным первой контрольной группы (n=12) в качестве гепатопротекторного препарата назначали коммерческий препарат сравнения Гепатоджект внутримышечно, 2-5 мл на животное в зависимости от его массы, 2 раза в день - 7 дней;

Животным 2 опытной группы (n=12) внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 3 опытной группы (n=12) внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 4 опытной группы (n=12) внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме.

Методика оценки результатов лечения основывалась на определении следующих показателей: длительность лихорадки, снижения аппетита, снижения общей активности, иктеричности слизистых оболочек, результатах гематологических и биохимических исследований венозной крови.

Исследование препарата проводились на животных, поступающих в клинику на прием к ветеринарному специалисту.

В основном это были животные в возрасте от 8 мес. до 6 лет, домашнего содержания, рацион которых состоял преимущественно из сухих и влажных кормов (80%) и пищи со стола (20%).

Критерием включения животных в эксперимент являлось проявление характерных клинических симптомов: повышение температуры до 39,5-40°C, что совпадало с первичным обнаружением паразитов в мазках крови (рисунок 30); анемия и желтушность видимых слизистых оболочек, склеры, конъюнктивы и непигментированных участков кожи. Частичное или полное отсутствие аппетита, рвота. Гемоглинурия разной степени интенсивности.

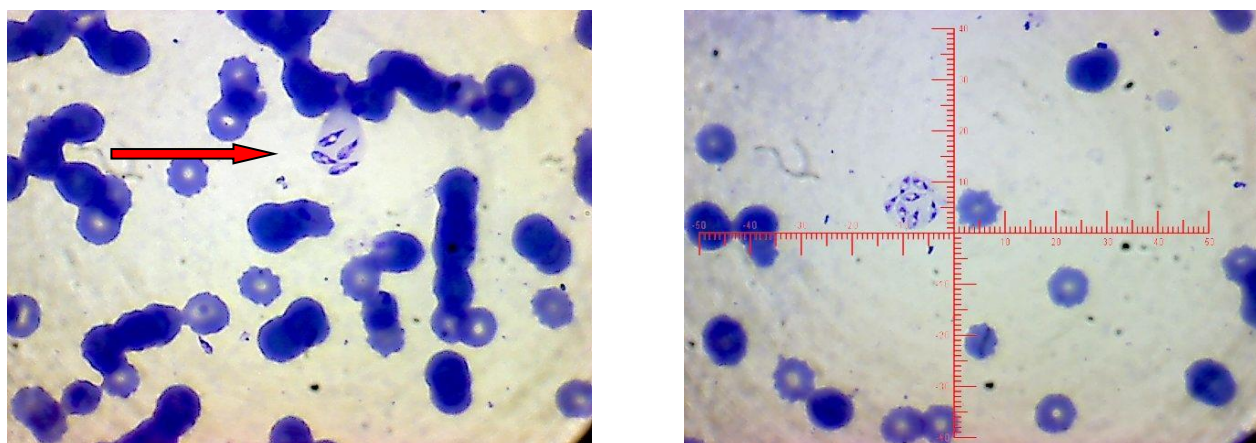


Рисунок 30 – Мазок крови. Окраска Романовского Гимза. X1000. Стрелками указаны внутриклеточные возбудители *Babesia canis*

При исследовании гематологических показателей крови (таблица 60) установлено достоверное снижение эритроцитов в 2 -2,5 раза, среднего объема эритроцита на 20%, гематокритной величины и гемоглобина в 2-2,5 раза относительно клинически здоровых животных, повышение лейкоцитов в основном за счет гранулоцитов в 2-3 раза относительно фоновых значений.

Результаты биохимических исследований показали (таблица 61), достоверное увеличение активности цитолитических ферментов печени аланиновой и аспарагиновой аминотрансфераз в 4-5 раз относительно клинически здоровых собак. Наряду с этим отмечается достоверное увеличение активности ферментов косвенно выступающих маркерами холестаза – щелочная фосфатаза в 1,5 – 2 раза и γ -глутамилтранспетидаза в 3-4 раза. Кроме того, отмечается нарушение пигментного обмена в печени, о чем свидетельствует повышение общего билирубина в 3-4 раза относительно фоновых значений, в основном за счет не конъюгированной фракции, что подтверждает гемолитический характер

анемии. Однако концентрация прямого билирубина в сыворотке крови также значительно повышена, что является следствием недостаточности транспортной системы выведения резко возросшей концентрации конъюгированного билирубина из клетки через желчные протоки.

При этом отмечается нарастание функциональной недостаточности гепатобилиарной системы, о чем свидетельствует снижение альбуминов в сыворотке крови животных на 30-40%, глюкозы в среднем 2 раза. А также отмечается достоверное повышение глобулиновых фракций белка на 5-10 %.

В мазках периферической крови (рисунок 30) окрашенных по Романовскому—Гимзе, обнаруживали грушевидной формы, одиночные и парные простейшие *Babesia canis*.

Таблица 60 - Гематологические показатели крови собак до лечения

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	Норма	1 группа (n=12)	2 группа (n=12)	3 группа (n=12)	4 группа (n=12)	Фон (n=248)
1.	WBC	$\times 10^9/L$	6,0-17,0	20,2 \pm 0,87*	22,5 \pm 2,04*	22 \pm 2,01*	24,35 \pm 2,54*	10,3 \pm 1,91
2.	LYM	$\times 10^9/L$	0,8-5,1	0,9 \pm 1,19	1,2 \pm 1,5	0,9 \pm 1,13	4,02 \pm 0,52	2,3 \pm 0,5
3.	MID	$\times 10^9/L$	0-1,8	0,6 \pm 0,35	1 \pm 0,63	0,5 \pm 0,33	0,76 \pm 0,52	0,7 \pm 0,15
4.	GRA	$\times 10^9/L$	4,0-12,6	18,7 \pm 0,33	20,3 \pm 0,42	20,6 \pm 0,93	19,56 \pm 0,62	7,2 \pm 1,87
5.	LYM	%	12,0-30,0	5 \pm 5,03	5,8 \pm 4,75	4,5 \pm 7,81	20,35 \pm 2,58	22,9 \pm 6,63
6.	MID	%	2,0-9,0	3,3 \pm 2,91	4,9 \pm 3,18	2,7 \pm 2,11	3,525 \pm 1,11	7,1 \pm 1,34
7.	GRA	%	60-83	91,7 \pm 2,65*	89,3 \pm 3,15*	92,8 \pm 8,2*	76,12 \pm 2,31	70 \pm 7,42
8.	RBC	$\times 10^{12}/L$	5,5-8,5	3,14 \pm 0,41*	4,8 \pm 0,74*	4,26 \pm 0,73*	3,87 \pm 0,65*	8,1 \pm 0,58
9.	HGB	g/L	110-190	54 \pm 7,91*	88 \pm 8,51*	77 \pm 4,7*	67 \pm 4,08*	155,2 \pm 24,25
10.	MCHC	g/L	300-380	391 \pm 5,41	413 \pm 9,01	440 \pm 7,69	405,5 \pm 7,55	328,8 \pm 34,22
11.	MCH	Pg	20,0-25,0	17,2 \pm 0,53	18 \pm 0,85	18,1 \pm 0,8	17,42 \pm 0,52	19,3 \pm 3,22
12.	MCV	Fl	62-72	44 \pm 1,35*	43,6 \pm 1,61*	41,1 \pm 1,8*	42,7 \pm 2,82*	58,4 \pm 4,08
13.	RDW-CV	%	11-15,5	17,5 \pm 0,29	19,3 \pm 0,32	21,2 \pm 0,57	17,8 \pm 1,14	13,6 \pm 0,85
14.	RDW-SD	Fl	35-56	38,4 \pm 1,35	42,1 \pm 1,41	43,6 \pm 1,66	37 \pm 3,34	39,6 \pm 2,87
15.	HCT	%	39-56	13,8 \pm 2,5*	21,3 \pm 3,08*	17,5 \pm 3,27*	16,45 \pm 2,65*	47,1 \pm 4,44
16.	PLT	$\times 10^9/L$	117-460	345 \pm 27,52	410 \pm 77,62	234 \pm 34,26	275 \pm 25,33	332,2 \pm 167,25
17.	MPV	Fl	7-12,9	9,4 \pm 0,42	8,4 \pm 0,37	8,8 \pm 0,43	8,55 \pm 0,33	8,3 \pm 1,07
18.	PDW	Fl	10,0-18	13,5 \pm 0,56	10 \pm 0,5	9,6 \pm 0,33	12 \pm 0,65	8,6 \pm 2,82
19.	PCT	%	0,1-0,5	0,324 \pm 0,03	0,347 \pm 0,04	0,206 \pm 0,19	0,233 \pm 0,14	0,3 \pm 0,17
20.	P-LCR	%	13,0-43	29,7 \pm 3,2	30,5 \pm 3,61	36,8 \pm 2,39	33,25 \pm 2,67	27,5 \pm 9,58

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10),

Таблица 61 - Биохимические показатели сыворотки крови собак до лечения

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	Норма	1 группа (n=12)	2 группа (n=12)	3 группа (n=12)	4 группа (n=12)	Фон (n=248)
1.	АЛТ	Е/л	15-62	214,79±22,06	186,56±20,21	209,64±12	187,85±16,22	45±5,46
2.	АСТ	Е/л	15-42	153,91±16,46	158,72±9,63	150,56±18,48	175,27±13,83	34,2±2,61
3.	ГГТ	Е/л	до 6,9	20,72±1,97	20,71±2,07	24,35±1	21,16±1,78	3,7±0,89
4.	Щелочная фосфатаза	Е/л	до 75	145,6±17,27	163,7±6,19	140,21±13,79	157,87±15,78	63,6±6,47
5.	Биллирубин общий	мкмоль/л	3,4-13,7	26,98±1,24	29,08±2,55	28,32±3,03	26,98±2,82	7,2±1,01
6.	Биллирубин прямой	мкмоль/л	0	10,21±0,97	12,6±1,26	9,22±0,91	10,05±0,44	0
7.	Глюкоза	ммоль/л	4,3-6,7	2,71±0,18	2,65±0,16	2,81±0,19	2,44±0,17	5,1±0,58
8.	Белок общий	г/л	54-73	61,57±3,67	59,17±4,61	57,52±5,64	56,02±5,78	67,3±2,08
9.	Альбумин	г/л	26-39	18,06±0,82	21,11±1,68	20,49±2,55	18,25±1,88	32,1±1,72
10.	Глобулин	г/л	28-36	37,71±3,12	33,4±4,21	39,48±4,42	38,59±4,52	35,2±1,3

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10),

При сравнении результатов лечения разных групп было обнаружено достоверное снижение сроков заболевания и проявления клинических признаков заболевания в 3 опытной группе животных которым в качестве гепатопротекторного средства назначали препарат силимарина конъюгированного с наночастицами селена (СилимаринКС) (рисунок 31).

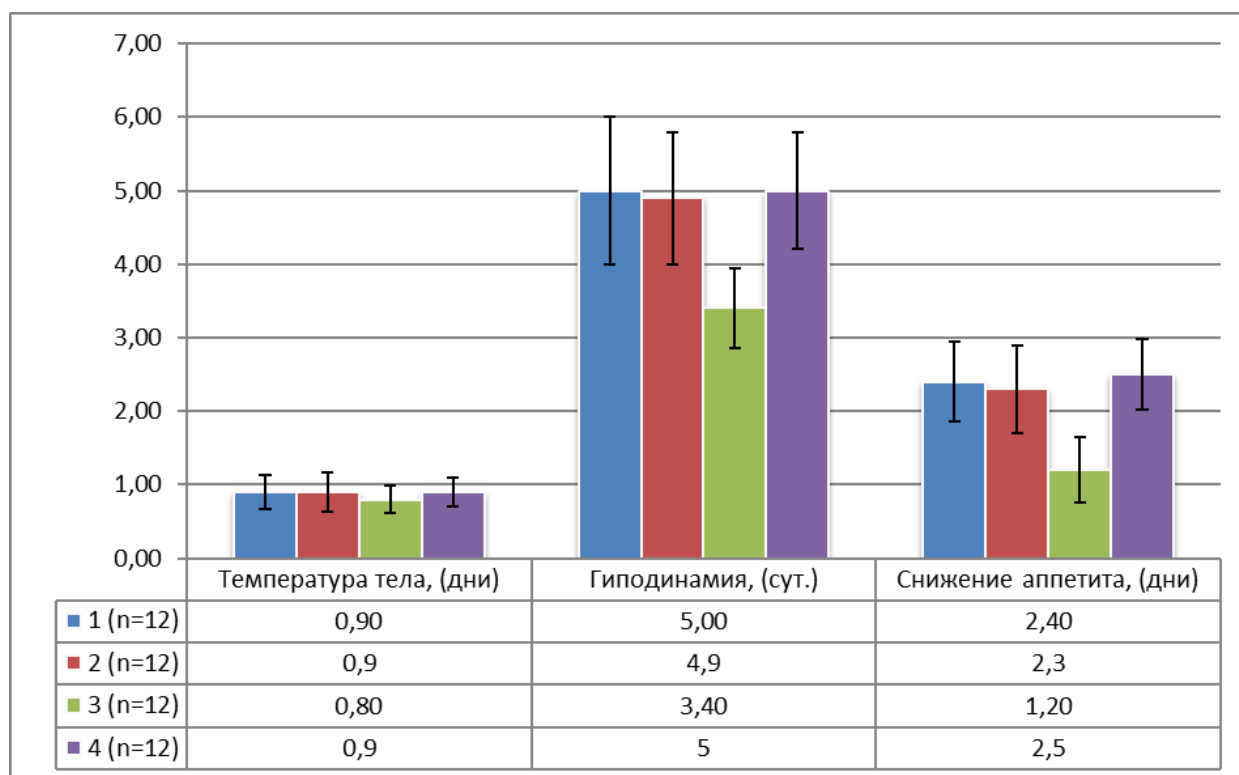


Рисунок 31 - Результаты клинических исследований животных

Наряду с этим, при анализе гематологических показателей крови на 14 е сутки эксперимента установлено (таблица 62), что положительная динамика развивается во всех группах животных.

Таблица 62 - Гематологические показатели крови собак через 14 суток после назначения терапевтических мероприятий

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	Норма	1 группа (n=12)	2 группа (n=12)	3 группа (n=12)	4 группа (n=12)	Фон (n=248)
1.	WBC	$\times 10^9/L$	6,0-17,0	17,2 \pm 1,43*	16,4 \pm 1,77*	12,9 \pm 1,36**	14,2 \pm 1,58*	10,3 \pm 1,91
2.	LYM	$\times 10^9/L$	0,8-5,1	2,5 \pm 0,51	7,3 \pm 0,36	4,3 \pm 0,25	5 \pm 0,09	2,3 \pm 0,5
3.	MID	$\times 10^9/L$	0-1,8	0,2 \pm 0,19	0,4 \pm 0,63	0,6 \pm 0,15	0,7 \pm 0,04	0,7 \pm 0,15
4.	GRA	$\times 10^9/L$	4,0-12,6	14,5 \pm 1,08	6,9 \pm 1,18	8 \pm 1,45	7,7 \pm 1,18	7,2 \pm 1,87
5.	LYM	%	12,0-30,0	14,8 \pm 0,26	22,9 \pm 0,25	30 \pm 1,2	30 \pm 0,26	22,9 \pm 6,63
6.	MID	%	2,0-9,0	1,1 \pm 0,79	7,6 \pm 0,91	4,6 \pm 0,79	4,7 \pm 0,12	7,1 \pm 1,34
7.	GRA	%	60-83	84,1 \pm 11,06	69,5 \pm 1,14	62,3 \pm 1,98	64,4 \pm 1,11	70 \pm 7,42
8.	RBC	$\times 10^{12}/L$	5,5-8,5	4,83 \pm 0,41*	5,42 \pm 0,45*	6,51 \pm 0,53**	5,11 \pm 0,56*	8,1 \pm 0,58
9.	HGB	g/L	110-190	136 \pm 6,88	160 \pm 5,78	180 \pm 8,51	116 \pm 7,52	155,2 \pm 24,25
10.	MCHC	g/L	300-380	477 \pm 18,53	474 \pm 19,43	375 \pm 114,61	337 \pm 13,98	328,8 \pm 34,22
11.	MCH	Pg	20,0-25,0	28,2 \pm 1,58	29,5 \pm 1,7	25 \pm 8,65	24,3 \pm 1,7	19,3 \pm 3,22
12.	MCV	fl	62-72	59,1 \pm 0,13	62,3 \pm 0,78	62,6 \pm 3,17	64,6 \pm 2,74	58,4 \pm 4,08
13.	RDW-CV	%	11-15,5	14,8 \pm 0,23	13,4 \pm 0,62	15,6 \pm 6,92	15,2 \pm 1,2	13,6 \pm 0,85
14.	RDW-SD	fl	35-56	42,5 \pm 1,24	40,6 \pm 1,64	46,7 \pm 7,45	47,6 \pm 1,64	39,6 \pm 2,87
15.	HCT	%	39-56	28,5 \pm 1,23	33,8 \pm 1,55	40,1 \pm 4,48	39 \pm 1,59	47,1 \pm 4,44
16.	PLT	$\times 10^9/L$	117-460	225 \pm 11,59	403 \pm 19,34	240 \pm 15,04	455 \pm 23,02	332,2 \pm 167,25
17.	MPV	fl	7-12,9	8,8 \pm 0,45	7,9 \pm 0,34	8,8 \pm 0,23	7,5 \pm 1,08	8,3 \pm 1,07
18.	PDW	fl	10,0-18	13,7 \pm 0,24	11,2 \pm 0,37	12,8 \pm 1,72	10,3 \pm 1,68	8,6 \pm 2,82
19.	PCT	%	0,1-0,5	0,198 \pm 0,02	0,317 \pm 0,03	0,21 \pm 3,27	0,412 \pm 0,01	0,3 \pm 0,17
20.	P-LCR	%	13,0-43	37,6 \pm 0,91	21,9 \pm 0,72	33 \pm 3,47	20,3 \pm 0,17	27,5 \pm 9,58

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10),

Так количество лейкоцитов периферической крови (рисунок 32) достигло физиологических значений во всех группах животных. Однако в первой, второй и четвертой группах, которым в качестве гепатопротекторных препаратов назначали соответственно «Гепатоджект», «СилимаринМ» и «СилимаринКЗ» данный показатель был достоверно выше чем у клинически здоровых животных. Тогда как в третьей опытной группе животных которым назначали препарат силимарина конъюгированного с коллоидным селеном количество лейкоцитов не имело достоверных отличий от фоновых значений. Вместе с этим в третьей опытной группе животных динамика гематологических показателей показала более выраженный результат, что является следствием сочетанного действия силимарина и селена входящих в состав препарата.

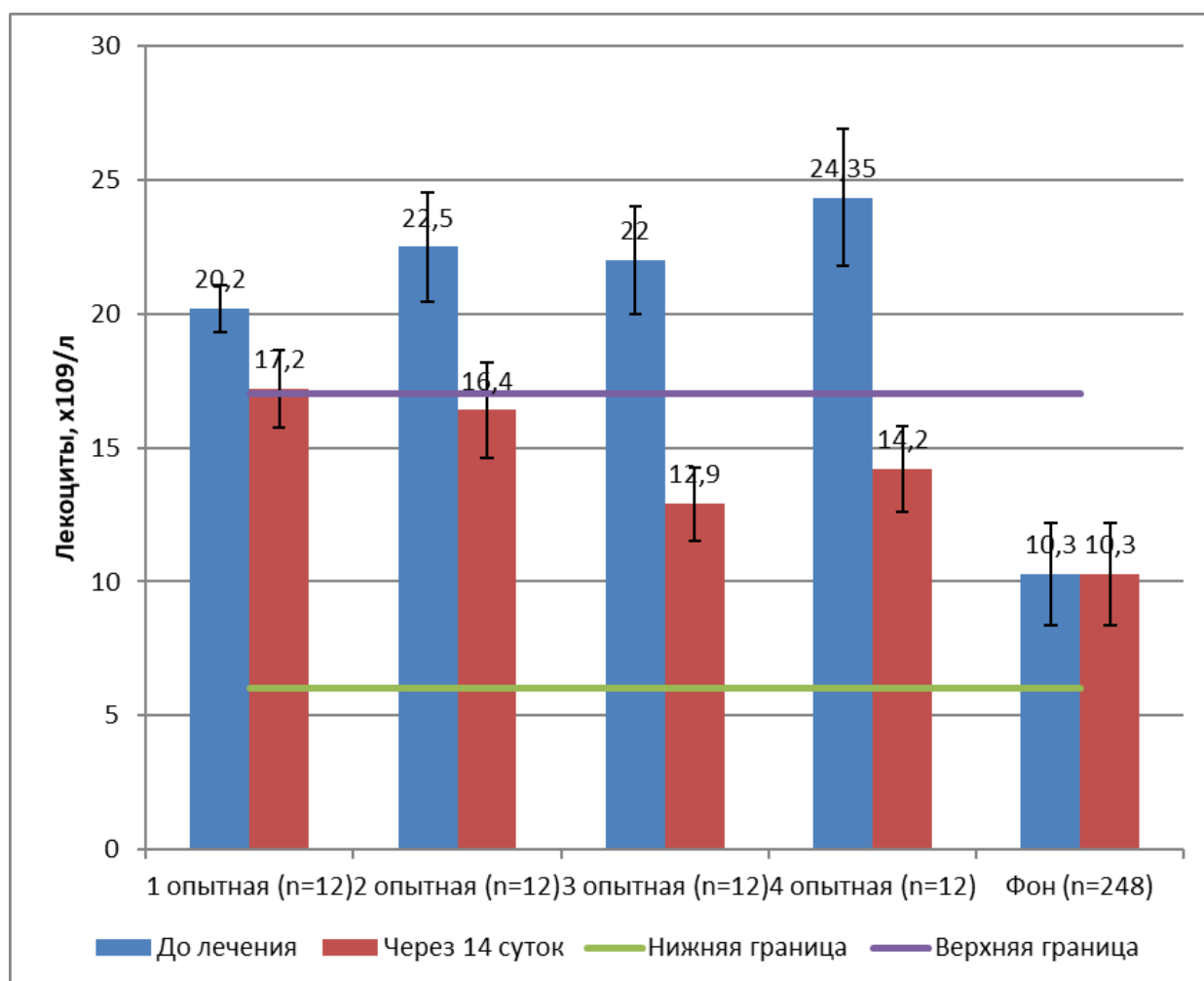


Рисунок 32 – Динамика изменений лейкоцитов крови собак

При анализе показателей красного ростка костного мозга на 14 сутки эксперимента установлено достоверное увеличение количества эритроцитов и гемоглобина в периферической крови животных всех опытных групп (рисунок 33-34). Однако, в группах животных которым назначали препарат сравнения «Гепатоджент» и испытуемые препараты «СилимаринМ» и «СилимаринКЗ» количество эритроцитов оставалось ниже референсных значений. Тогда как у животных 3 опытной группы данный показатель достигал физиологической нормы, хотя и оставался достоверно ниже чем в фоновой группе.

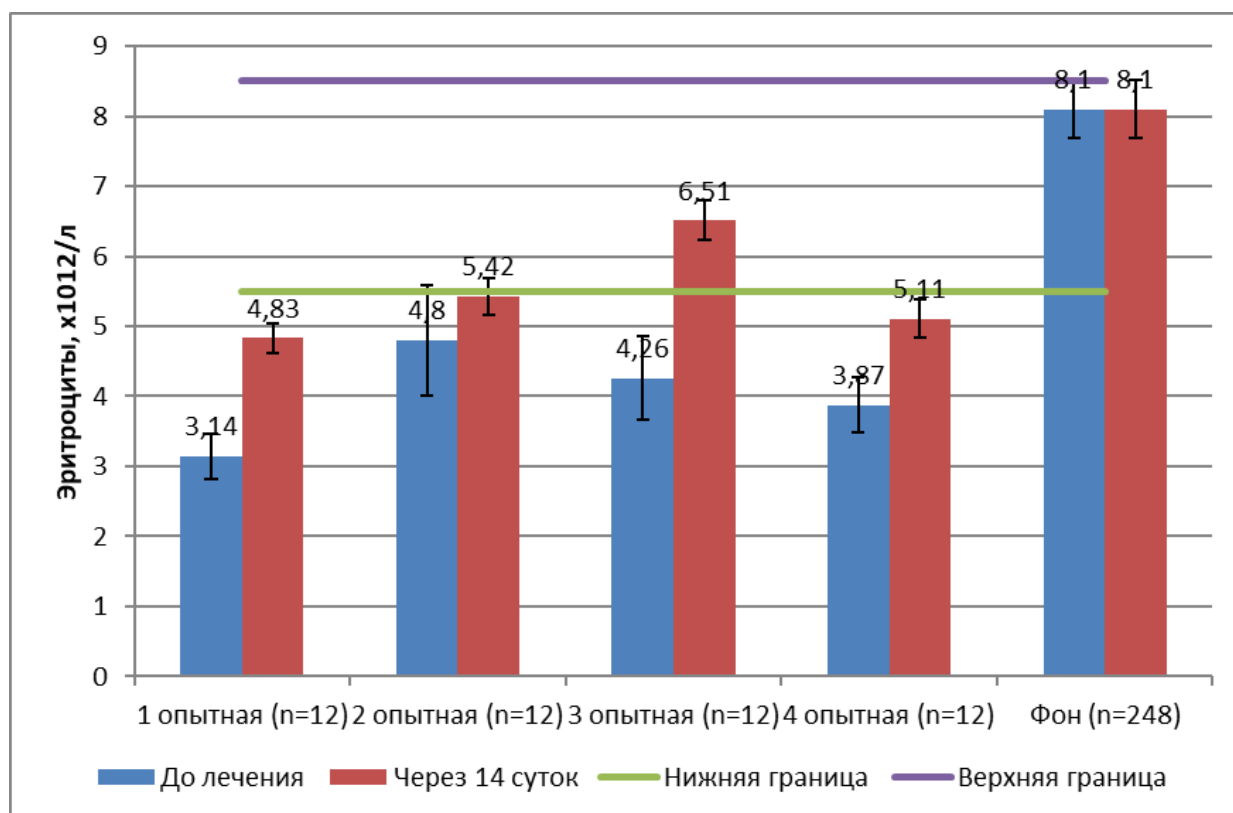


Рисунок 33 – Динамика изменений эритроцитов крови собак

Концентрация гемоглобина (рисунок 34) во всех опытных группах животных достигала физиологической нормы через 14 суток после назначения терапевтических мероприятий. Вместе с этим, у животных которым назначали препарат «СилимаринКС» коцентрация гемоглобина была достоверно выше чем в остальных опытных группах.

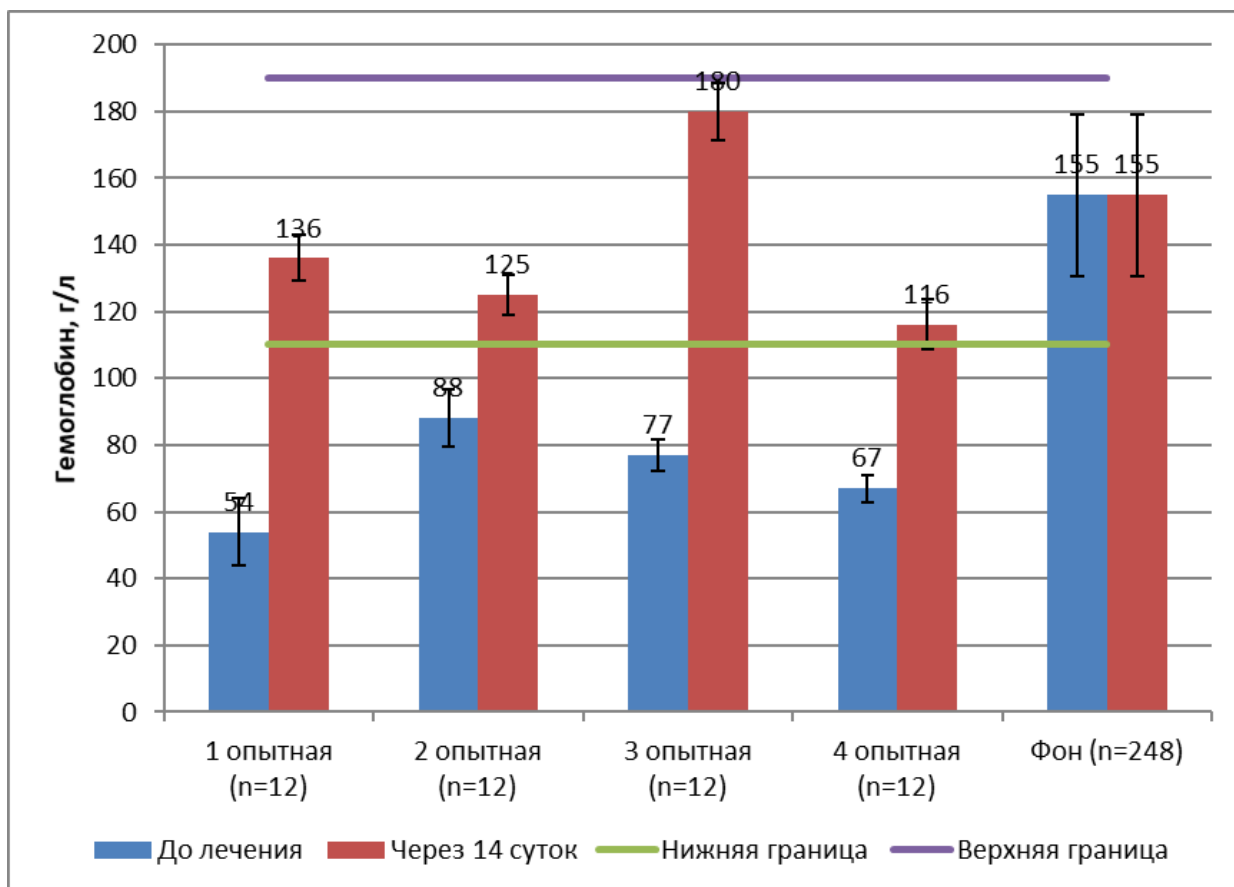


Рисунок 34 – Динамика изменений концентрации гемоглобина в крови собак

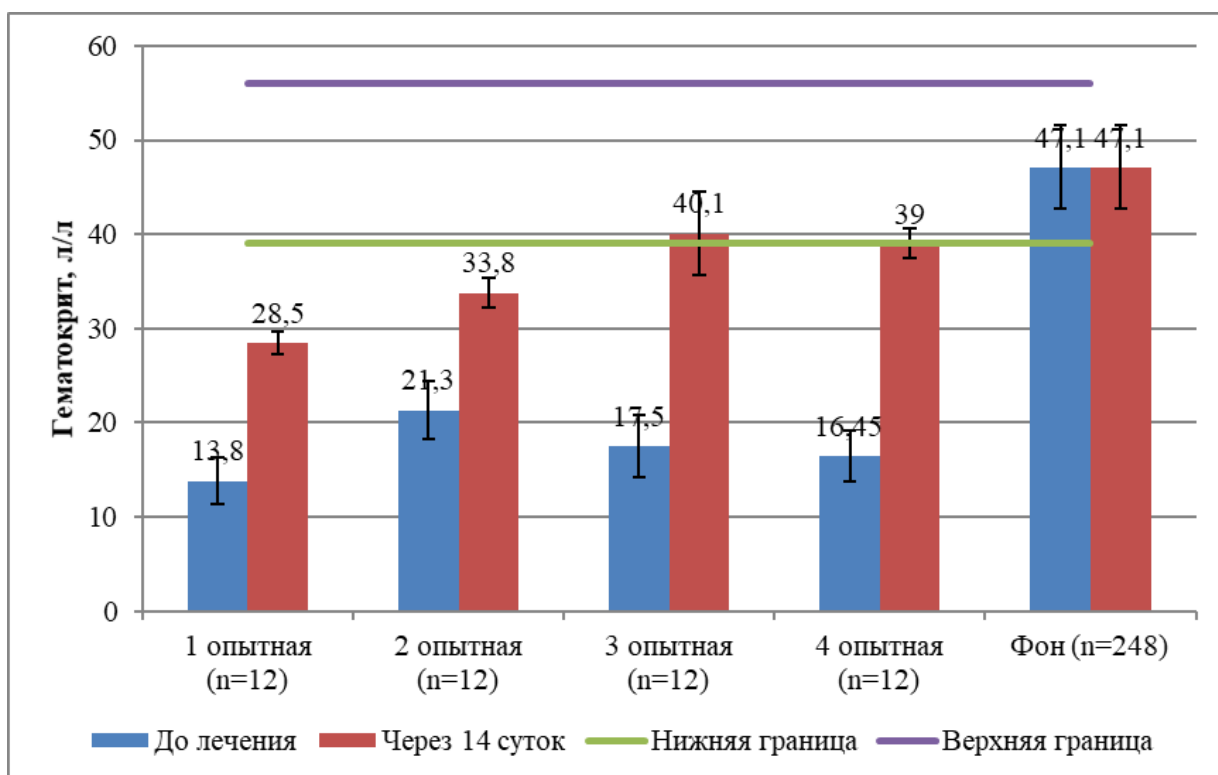


Рисунок 35 – Динамика изменений гематокритной величины в крови собак

Показатель отношения объема форменных элементов к плазме крови (рисунок 35) в первой и второй группе животных хотя и повысился относительно первоначальных значений, все же оставался ниже физиологических границ. Тогда как в 3 и 4 группах животных показатель гематокритной величины находился на нижней границе нормы.

При оценке биохимических показателей крови (таблица 63), также наблюдалась положительная динамика как ферментного спектра сыворотки крови опытных животных. Что свидетельствует о стабилизации клеточных мембран гепатоцитов. Так и субстратов характеризующих функциональную активность печени.

Вместе с этим, наблюдается прямая корреляционная связь с гематологическими показателями. В третьей опытной группе динамика положительных изменений проявлялась более выражено по сравнению другими опытными группами.

Таблица 63 - Биохимические показатели сыворотки крови собак через 14 суток после назначения терапевтических мероприятий

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	Норма	1 группа (n=12)	2 группа (n=12)	3 группа (n=12)	4 группа (n=12)	Фон (n=248)
1.	АЛТ	Е/л	15-62	133,47±10,87	130,16±11,45	95,7±11,76	135,11±9,59	45±5,46
2.	АСТ	Е/л	15-42	82,81±8,03	82,95±8,06	53,9±4,87	80,61±5,71	34,2±2,61
3.	ГГТ	Е/л	до 6,9	8,25±0,59	7,53±0,23	6,5±0,46	7,98±0,34	3,7±0,89
4.	Щелочная фосфатаза	Е/л	до 75	79,41±5,3	82,7±4,24	70,04±3,44	81,8±10,22	63,6±6,47
5.	Билирубин общий	мкмоль/л	3,4-13,7	14,62±1,48	15,13±1,73	11,6±1,06	15,61±1,05	7,2±1,01
6.	Билирубин прямой	мкмоль/л	0	2,37±0,09	2,51±0,21	1,21±0,12	2,42±0,18	0
7.	Глюкоза	ммоль/л	4,3-6,7	5,15±0,49	5,4±0,39	4,96±0,56	5,42±0,45	5,1±0,58
8.	Белок общий	г/л	54-73	59,85±6,56	60,99±7,38	62,12±5,57	54,02±0,87	67,3±2,08
9.	Альбумин	г/л	26-39	29,76±3,33	28,52±2,95	30,29±1,68	27,91±2,35	32,1±1,72
10.	Глобулин	г/л	28-36	30,09±4,12	32,47±3,21	31,83±3,72	26,11±4,52	35,2±1,3

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10),

Через 14 суток после назначения терапии у животных всех опытных групп отмечалось достоверное снижение ферментов цитолиза. Так активность аланинаминотрансферазы (рисунок 36) снизилась в первой опытной группе на 38% ($p \leq 0,05$), во второй на 30 % ($p \leq 0,05$), в третьей в 2,2 раза ($p \leq 0,05$), в четвертой опытной группе на 38 % ($p \leq 0,05$). Наиболее интенсивное снижение активности данного фермента отмечали в третьей опытной группе собак, которым назначали препарат силимарина конъюгированного с наночастицами селена. В данной группе активность фермента была достоверно ниже, чем в остальных группах животных. Хотя стоит отметить, что у собак всех групп активность аланинаминотрансферазы оставалась достоверно выше референсных величин.

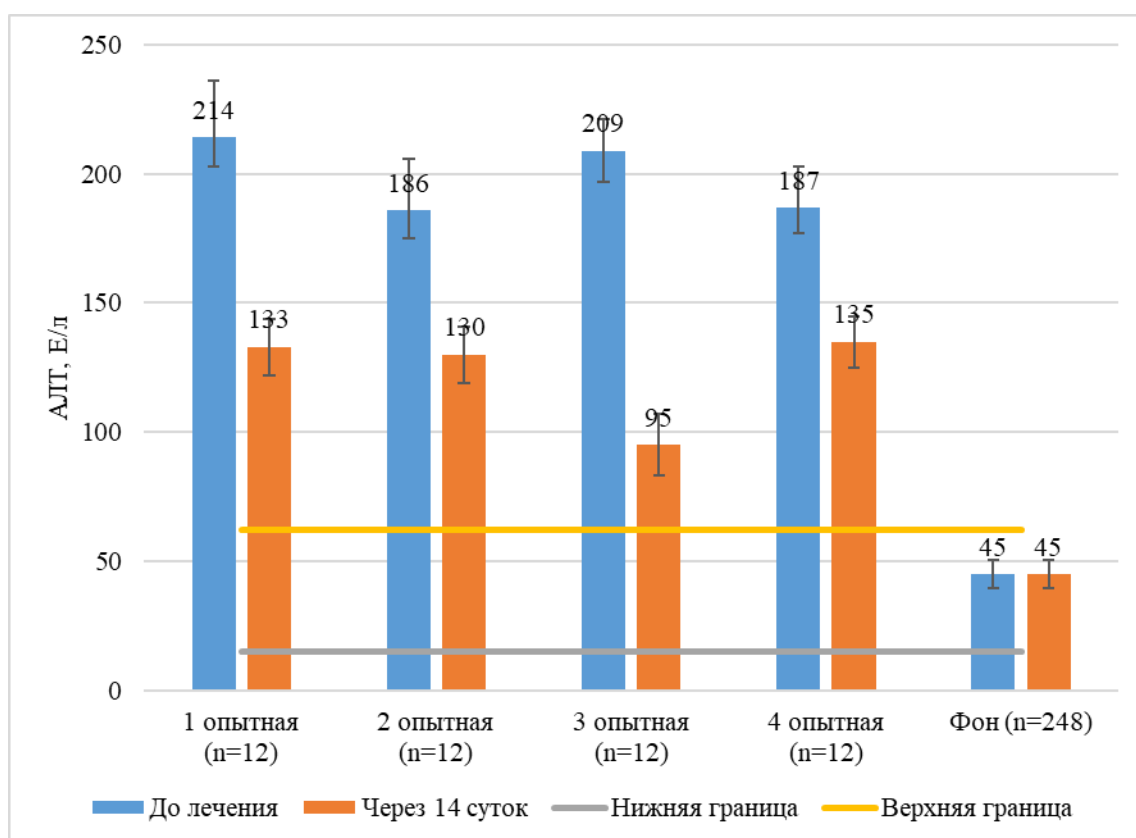


Рисунок 36 – Динамика изменений активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови собак

Наряду с этим, на 14 сутки эксперимента отмечали достоверное снижение еще одного цитолитического фермента – аспартатаминотрансферазы (рисунок 37). В первой группе в 1,8 раза ($p \leq 0,05$), во второй – в 1,9 ($p \leq 0,05$), в третьей

группе наблюдали наиболее интенсивное снижение в 2,8 раза ($p \leq 0,05$) и в четвертой опытной группе в 2,2 раза ($p \leq 0,05$) относительно исходных значений. Вместе с этим, активность данного фермента оставалась на достоверно высоком уровне относительно референсных величин.

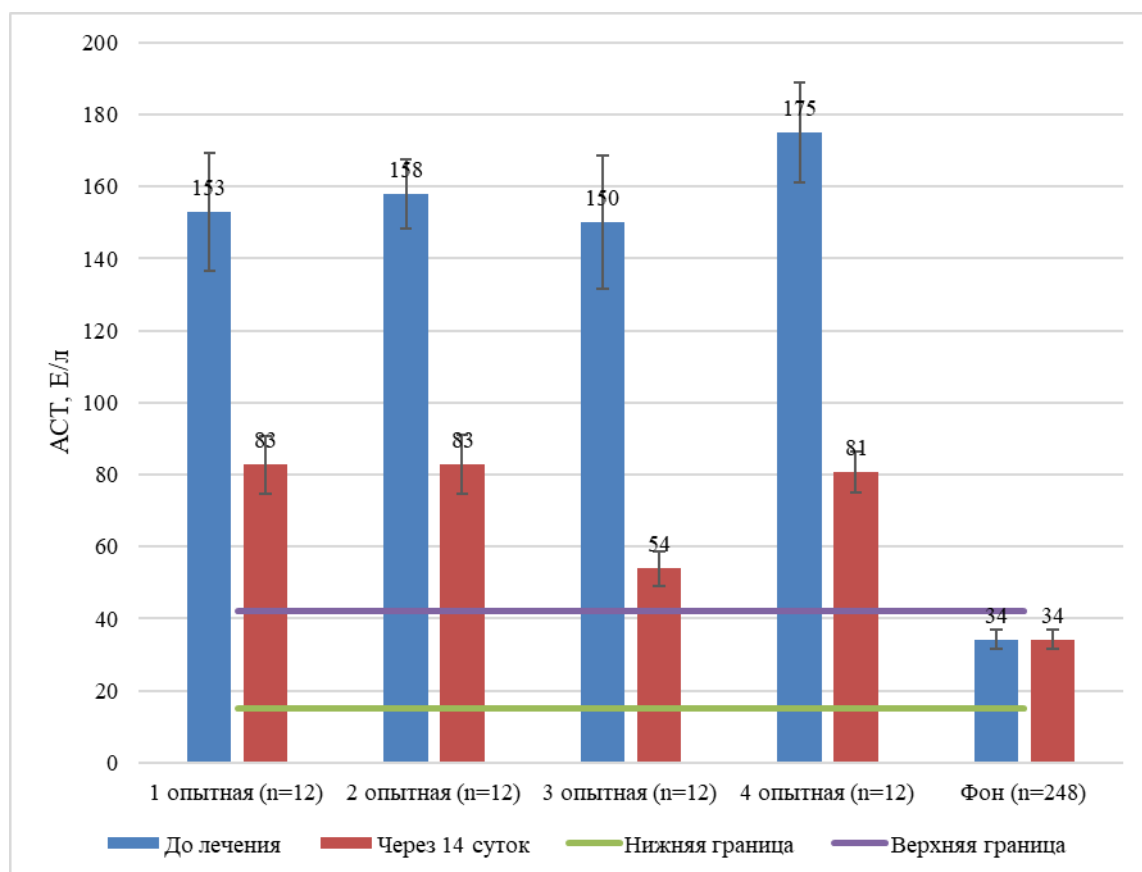


Рисунок 37 – Динамика изменений активности аспаратаминотрансферазы в сыворотке крови собак

Анализ динамики изменений активности ферментов холестаза показал достоверное снижение активности щелочной фосфатазы (рисунок 38) во всех опытных группах животных относительно первоначальных значений. Так в первой опытной группе собак, которым назначали коммерческий гепатопротекторный препарат «Гепатоджект» активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови снизилась в 1,8 раза ($p \leq 0,05$). Во второй (СилимаринМ) и третьей (СилимаринКС) в 2 раза ($p \leq 0,05$) и в четвертой (СилимаринК3) опытной группе в 1,9 раза ($p \leq 0,05$) относительно исходных значений. Стоит отметить, что референсных значений активность данного фермента достигла лишь в третьей

опытной группе собак, которым в качестве гепатопротектора назначали препарат силимарина конъюгированного с наночастицами селена.

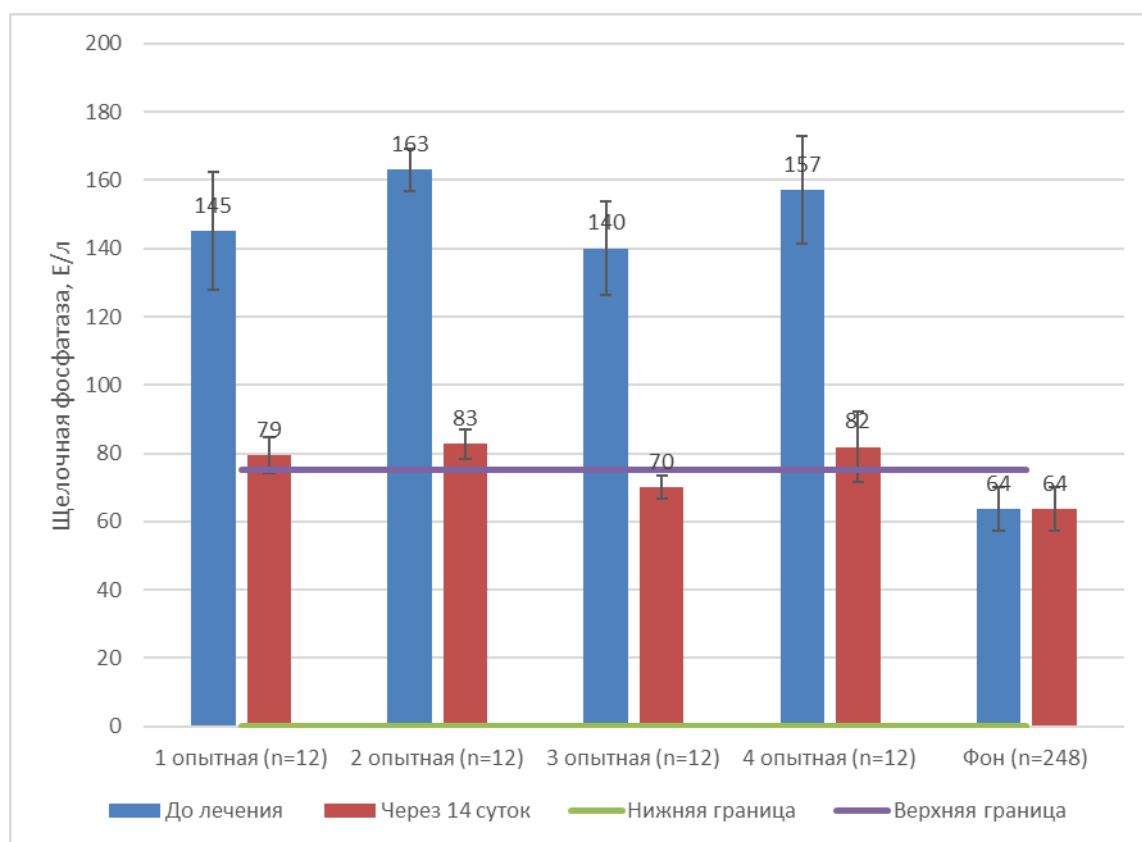


Рисунок 38 – Динамика изменений активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови собак

Активность γ -глутамилтранспетидазы (рисунок 39) в сыворотке крови опытных животных также достоверно снизилась. Так в первой и второй опытных группах в 2,5 раза ($p \leq 0,05$), в третьей в 3,4 раза ($p \leq 0,05$) и в четвертой – в 2,6 раза ($p \leq 0,05$) относительно первоначальных значений. Однако ни в одной группе животных активность ферментов холестаза не достигла значений фоновой группы.

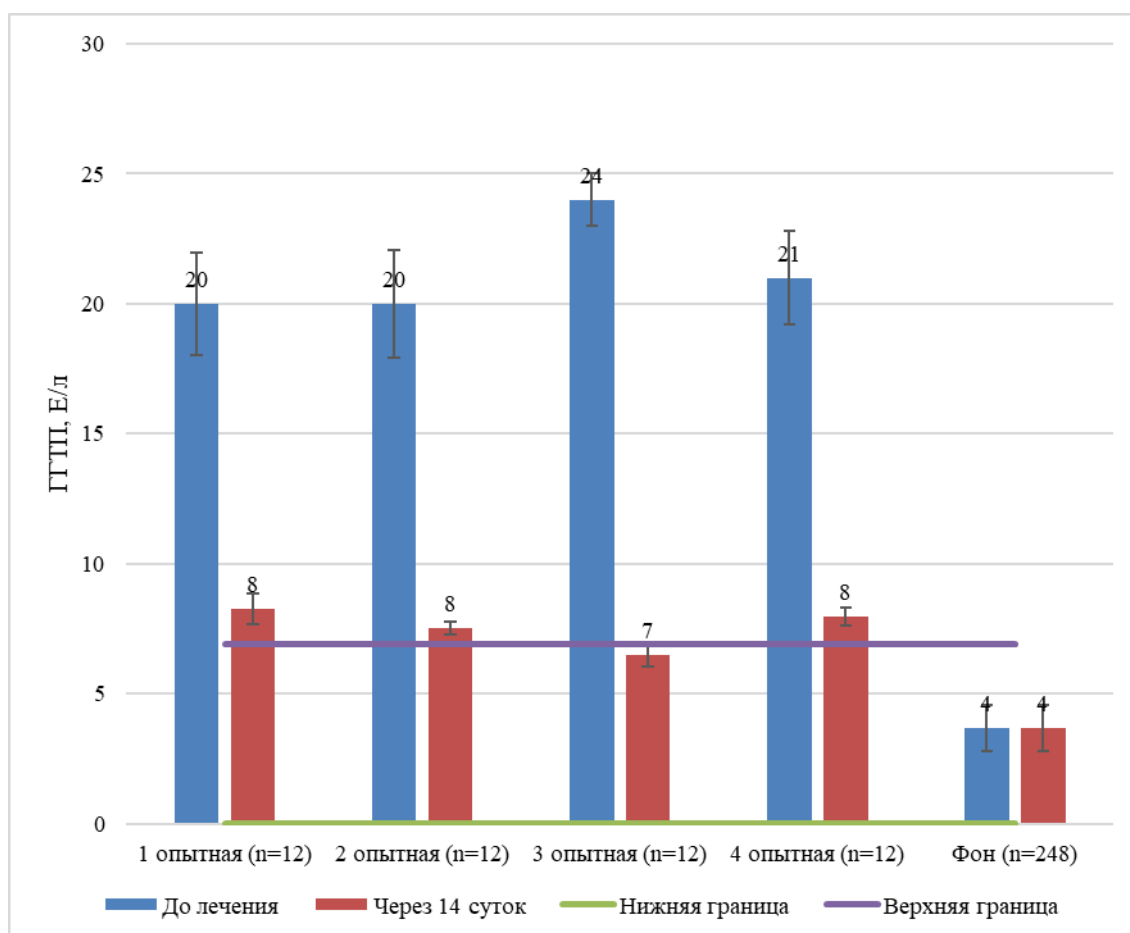


Рисунок 39 – Динамика изменений активности γ -глутамилтранспетидазы в сыворотке крови собак

При анализе показателей пигментного обмена во всех опытных группах животных отмечалось достоверное снижение как общего, так и прямого билирубинов в сыворотке крови (рисунок 40-41). Так через 14 суток после назначения лечебных мероприятий концентрация общего и прямого билирубина снизилась соответственно в первой группе животных в 1,8 и 4,2 раза ($p \leq 0,05$), во второй – в 1,9 и 5,2 раза ($p \leq 0,05$), в третьей в 2,3 и 7,5 раз ($p \leq 0,05$), в четвертой в 1,7 и 4,2 раза ($p \leq 0,05$) относительно значений до назначения терапии. Вместе с этим нельзя не отметить, что концентрация общего билирубина в сыворотке крови животных достигла референсных значений только в третьей опытной группе. Хотя и оставалась достоверно выше чем в фоновой. Тогда как уровень прямого билирубина не достиг физиологической нормы ни в одной из групп.

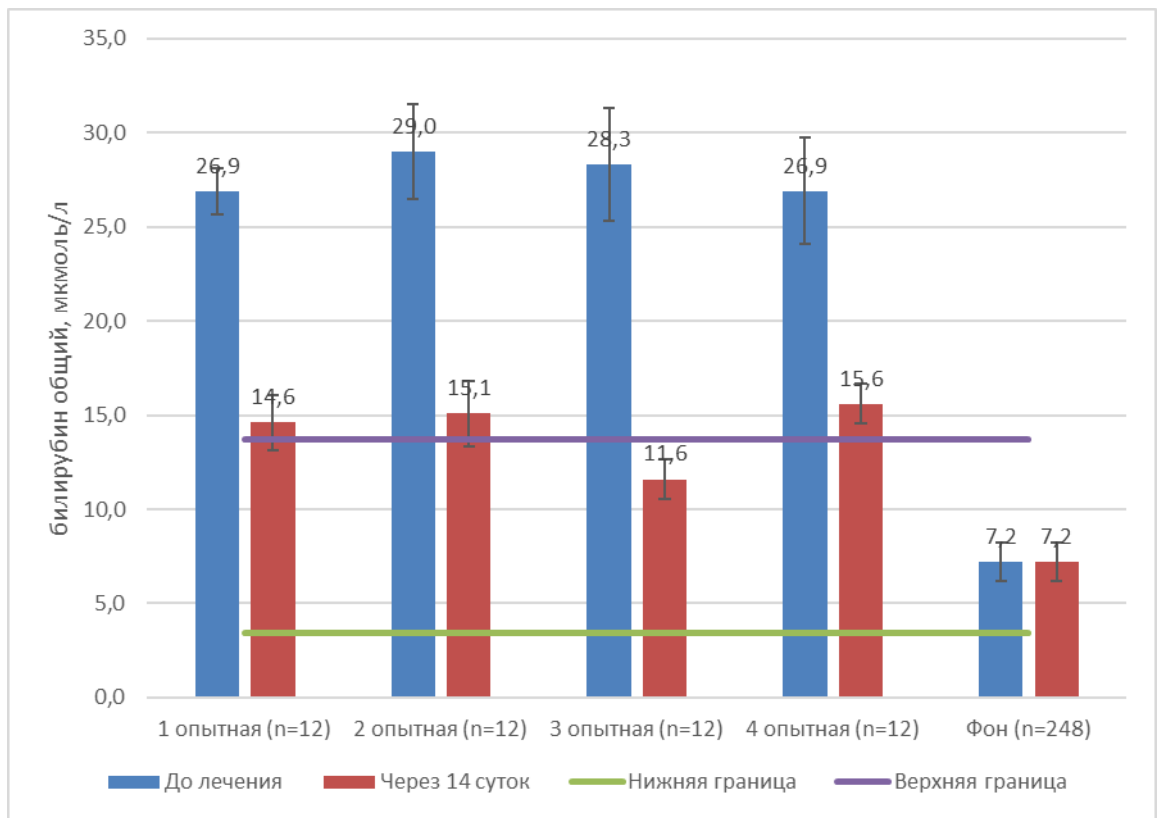


Рисунок 40 – Динамика изменений концентрации общего билирубина в сыворотке крови собак

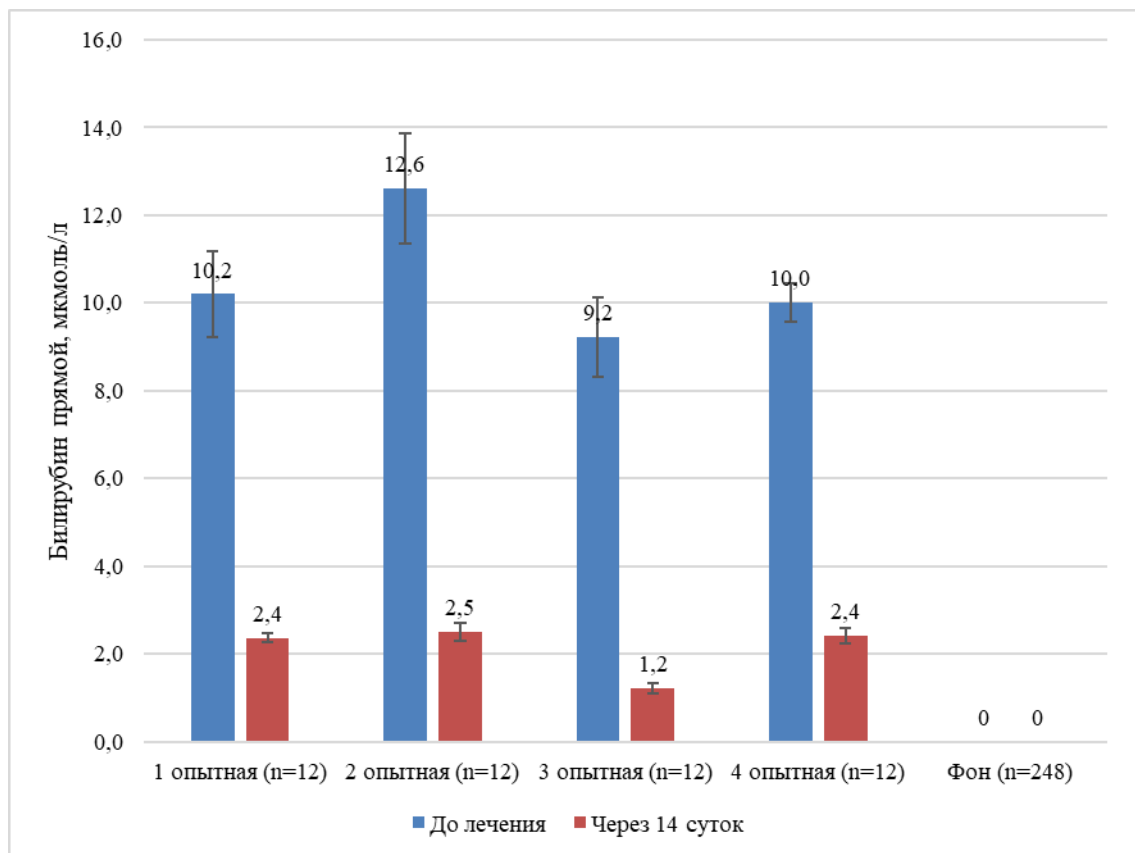


Рисунок 41 – Динамика изменений концентрации прямого билирубина в сыворотке крови собак

В ходе исследований по изучению терапевтической активности разработанных препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц установлено, что на 14 сутки после проведения терапевтических мероприятий восстанавливается альбуминсинтезирующая функция печени. О чем свидетельствует повышение концентрации сывороточного альбумина (рисунок 42) до референсных значений. Так в первой опытной группе уровень альбумина повысился с $18,06 \pm 0,82$ до $29,76 \pm 3,33$ г/л ($p \leq 0,05$), во второй - с $21,11 \pm 1,68$ до $28,52 \pm 2,95$ г/л ($p \leq 0,05$), в третьей - с $20,49 \pm 2,55$ до $30,29 \pm 1,68$ г/л ($p \leq 0,05$) и в четвертой - с $18,25 \pm 1,88$ до $27,91 \pm 2,35$ г/л ($p \leq 0,05$). Однако ни в одной группе, кроме третьей не достиг фонových значений - $32,1 \pm 1,72$ г/л

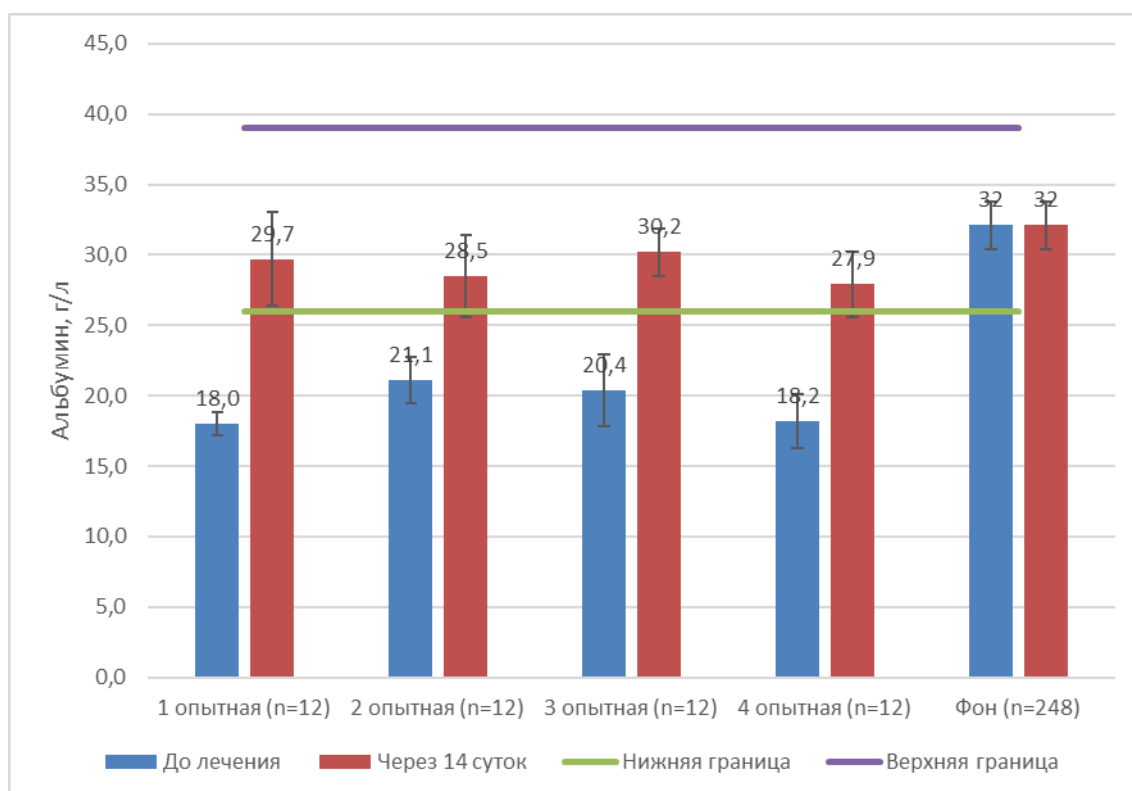


Рисунок 42 – Динамика изменений концентрации альбумина в сыворотке крови собак

Концентрация глобулиновых фракций белка (рисунок 43) снизилась до референсных значений во всех опытных группах животных. В первой - с $37,71 \pm 3,12$ до $30,09 \pm 4,12$ г/л ($p \leq 0,05$), во второй - $33,4 \pm 4,21$ до $32,47 \pm 3,21$ г/л, в третьей с $39,48 \pm 4,42$ до $31,83 \pm 3,72$ г/л ($p \leq 0,05$) и в четвертой - $38,59 \pm 4,52$ до

26,11±4,52 г/л ($p \leq 0,05$). Данный факт является следствием снижения мезенхимально-клеточной реакции организма в ответ на действие повреждающего агента.

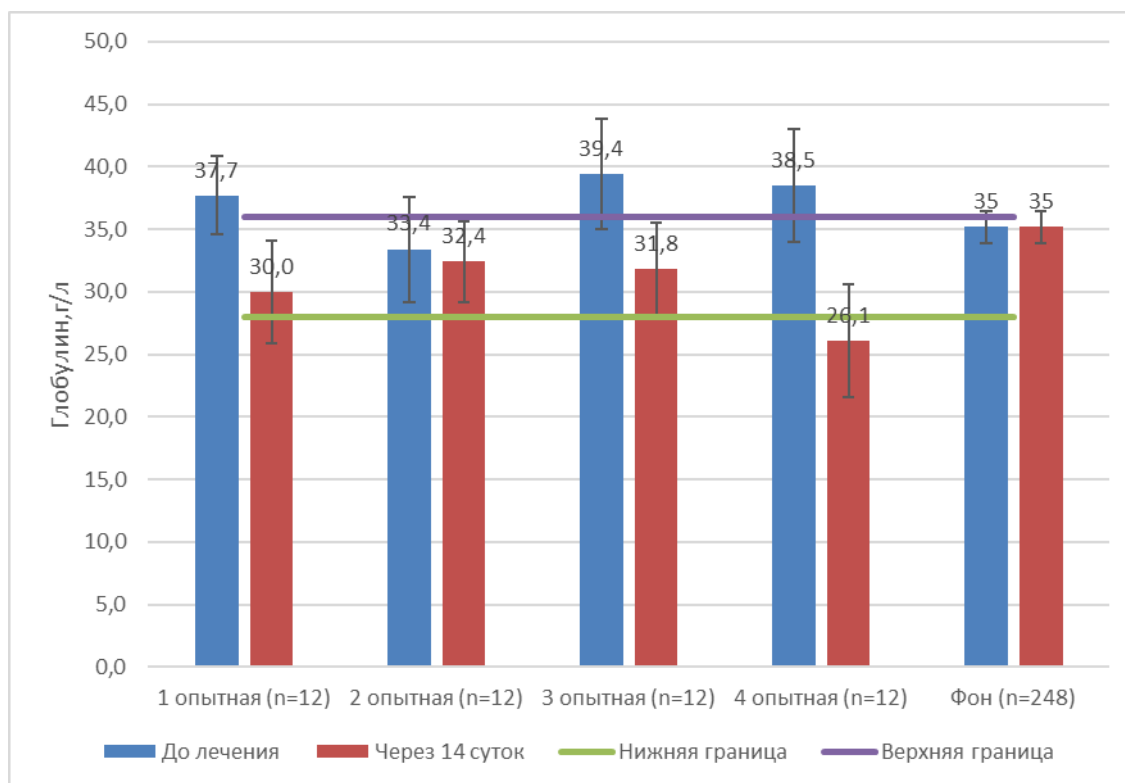


Рисунок 43 – Динамика изменений концентрации глобулина в сыворотке крови собак

В ходе исследований показателей антиоксидантной системы (таблица 64), установлено достоверное снижение концентрации малонового диальдегида до фоновых значений в третьей группе животных которым назначали препарат силимарина конъюгированного с коллоидным селеном. Тогда как в остальных группах животных хотя и наблюдалась положительная динамика, данный показатель оставался достоверно выше фоновых значений.

Вместе с этим активность глутатионпероксидазы во всех группах животных не имела достоверных отличий от фоновых животных, что как уже говорилось является следствием включения компенсаторных механизмов в организме животных. Однако, в третьей опытной группе к концу эксперимента активность данного показателя была выше как опытных групп, так и фоновых значений. Что указывает на включение селена содержащегося в препарате в метаболический

цикл антиоксидантной системы организма животных.

Таблица 64 - Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы защита крови собак

Сроки исследований	1 контрольная (n=12)	2 опытная (n=12)	3 опытная (n=12)	4 опытная (n=12)	Фон (n=248)
	МДА, нмоль/л				
До лечения	18,12±0,81*	17,27±1,01*	18,17±0,95*	18,36±0,91*	4,96±0,97
Через 14 суток	9,79±1,01*	10,33±0,66*	3,97±0,49	9,72±0,71*	4,96±0,97
	Глутатионпероксидаза, мкмоль G-SH /л x мин				
До лечения	21,74±2,9	22,06±2,12	21,98±2,51	21,11±2,04	22,7±2,84
Через 14 суток	21,15±2,33	21,7±2,42	33,18±2,59*	23,31±2,51	22,7±2,84

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10),

Таким образом, достоверно установлено, что парентеральное применение с терапевтической целью препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц приводит к восстановлению функциональной активности печени при инвазионном гепатите у собак.

Вместе с этим, препарат силимарина на основе коллоидного селена наряду ярко выраженными гепатопротекторными свойствами, проявил выраженное антиоксидантное действие, в результате чего активнее осуществляются процессы регенерации и связывание токсических веществ.

3.2.6.3 Терапевтическая эффективность препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц при токсической дистрофии у поросят

Целью данного исследования явилось изучение терапевтической эффективности препаратов силимарина на основе наночастиц (селена и золота) и полимерных матриц при токсической дистрофии печени у поросят отъемного периода.

Предметом исследования были поросята отъемного периода, которых идентифицировали, лечили и оценивали в отношении переменной исследования на индивидуальной основе.

Все животные подвергались комплексному обследованию, которое включало в себя клиническое и лабораторное исследование.

Исходя из полученных в ходе выше указанных исследований, проводили формирование групп по сходным клиническим признакам и физиологическим показателям.

В исследование были включены 56 поросят-отъемышей с диагнозом токсическая дистрофия печени в возрасте 35-40 дней.

Критерием отбора в группу для исследований являлось наличие симптомов поражения гепатобилиарной системы и установленного на основании клинико-лабораторных исследований токсическая дистрофия печени (таблица 65).

Таблица 65 - Дизайн эксперимента по изучению терапевтической эффективности препаратов силимарина на основе наночастиц (селена и золота) и полимерных матриц при токсической дистрофии печени у поросят отъемного периода

Лечебная группа	Схема лечения препарат	Способ применения	Объем, кратность, курс	Общее количество животных
1	Гепатоджект (препарат сравнения)	внутримышечно	2-5 мл, 1 раз в день, 7 дней	14
2	«Мицелярный раствор силимарина» (испытуемый препарат)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	14
3	«Коллоидный селен и силимарин» (испытуемый препарат)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	14
4	«Коллоидное золото и силимарин» (испытуемый препарат)	внутримышечно	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	14

После включения в исследование поросят взвесили и сформировали 14 блоков по 4 животных в каждом. Последовательно основанных на весе тела, возрасте и клинических симптомах заболевания. Которых в произвольном порядке распределили в одну из 4 групп.

Животные всех групп содержались в одинаковых условиях и получали сбалансированный по белку и всем биологически-активным веществам комбикорм. Анализ кормов на микотоксины (Т-2 токсин, афлатоксин), выявил, что их концентрация соответствовала ПДК. Кислотное число комбикормов также

соответствовало показателям безопасности кормов, но часто находилось на верхней границе предельно-допустимых концентраций. Несмотря на то, что содержание микотоксинов находилось в пределах нормы, следует учесть, что при длительном их поступлении возможна кумуляция (накопление в организме), что сопровождается развитием в печени дистрофических изменений на почве хронической интоксикации.

Для купирования патологических процессов нами были назначены гепатопротекторные средства:

Животным первой контрольной группы (n=14) в качестве гепатопротекторного препарата назначали коммерческий препарат сравнения Гепатоджект внутримышечно, 2-5 мл на животного в зависимости от его массы, 2 раза в день - 7 дней;

Животным 2 опытной группы (n=14) внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 3 опытной группы (n=14) внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 4 опытной группы (n=14) внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме.

Методика оценки результатов лечения основывалась на определении следующих показателей: длительность снижения аппетита, снижения общей активности, иктеричности слизистых оболочек, результатах гематологических и биохимических исследований венозной крови.

Критерием включения животных в эксперимент являлось проявление характерных клинических симптомов: общее угнетение, периодическое кратковременное разжижение кала, который приобретал светло-коричневую окраску, мышечной слабостью, иногда судорогами, анорексией, в некоторых

случаях акроцианозом. Больные животные отставали в росте от здоровых поросят данного возраста.

В периферической крови поросят (таблица 6б) отмечали повышение общего количества лейкоцитов выше референсных значений, а также снижение количества эритроцитов и гемоглобина, что указывает на развитие анемии. Учитывая тот факт, что анемия носила микроцитарный характер, целесообразно исключить дефицит железа в организме животных.

Однако, при изучении биохимических показателей сыворотки крови, концентрация железа и ОЖСС находились в пределах физиологических границ и достоверно от фоновых значений не отличались. Исходя из этого целесообразно предположить железо перераспределительный характер анемии.

Вместе с этим, на поражение печени указывало повышение активности цитолитических ферментов аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы в сыворотке крови обследуемых животных.

Активность трансаминаз сыворотки крови является достаточно чувствительным индикатором повреждения гепатоцитов, вызванного воздействием агрессивных факторов как внешней, так и внутренней среды организма.

Данные ферменты высвобождаются во внеклеточное пространство при повреждении или полной деструкции клеток. Увеличение активности аланиновой трансаминазы наблюдается при разрушении клеток печени, и является стойким и выраженным. В норму данный показатель возвращается в случае прерывания цитолиза, данные биохимии по нему восстанавливаются в течение 14 суток.

Наряду с этим в качестве индикаторного фермента печени используется сывороточная активность аспартатаминотрансферазы. Это преимущественно митохондриальный фермент. Повышение концентрации данного фермента свидетельствует о поражении печени только при одновременном подъёме аспартатаминотрансферазы.

Вместе с этим, как показано в таблице 67, отмечается достоверное увеличение активности ферментов холестаза – щелочной фосфатазы и γ -глутамилтрансферазы соответственно в 1,5-2 раза и на 20-30%.

Наряду с этим, о снижении функциональной активности гепатоцитов свидетельствует снижение концентрации общего белка в сыворотке крови животных, в основном за счет альбуминовой фракции. Однако концентрация глобулинов также достаточно сильно понижена, что может указывать на снижение иммунологической реактивности организма.

Вместе с этим отмечается достоверное снижение уровня сывороточной глюкозы, что также указывает на снижение функциональной активности печени. Учитывая тот факт, что стабильность гликемии в значительной мере обеспечивает синтез и расходование гликогена. Который важен не только для поддержания постоянства гликемии, он представляет собой также мощный резервуар энергии. Гликоген образуется исключительно в печени. Поэтому поражение органа ведет к нарушению его метаболизма. Что в свою очередь приводит к нарушениям углеводного обмена.

При анализе полученных данных, установлено также достоверное увеличение билирубина в сыворотке крови животных в среднем в 1,5 раза.

В гепатоцитах с помощью фермента билирубингликозилтрансферазы происходит конъюгация глюкуроновой кислоты и билирубина с образованием конъюгированного (прямого, связанного) билирубина. Конъюгированный (прямой) билирубин водорастворим, но не растворим в жирах, может проникать через почечный барьер. Этот вид пигмента относительно малотоксичен для головного мозга, хуже, чем неконъюгированный билирубин, связывается с сывороточным альбумином.

Образовавшийся конъюгированный (прямой) билирубин активно транспортируется к билиарной мембране гепатоцита после чего экскретируется в желчный капилляр.

Система конъюгации билирубина в печени обычно использует около 2% мощности гепатоцита, система экскреции - 10%. Тем самым, нарушение в

гепатобилиарной системе ведет к накоплению в организме либо неконъюгированного билирубина, так как гепатоциты не справляются со своей функцией. Либо – конъюгированного, вследствие нарушения экскреции последнего в желчь, в результате сужения протоков и повышенного его образования. Таким образом, анализируя полученные данные клинико-лабораторных исследований, установлено нарушение функциональной активности гепатобилиарной системы вызванное токсическим поражением печени.

При морфологическом исследовании гистологических препаратов, изготовленных из печени от павших поросят выявлены характерные для этого синдрома изменения: балочная структура нарушена, умеренно выраженная гиперемия сосудов, очаговая гидропическая дистрофия (рисунок 44).

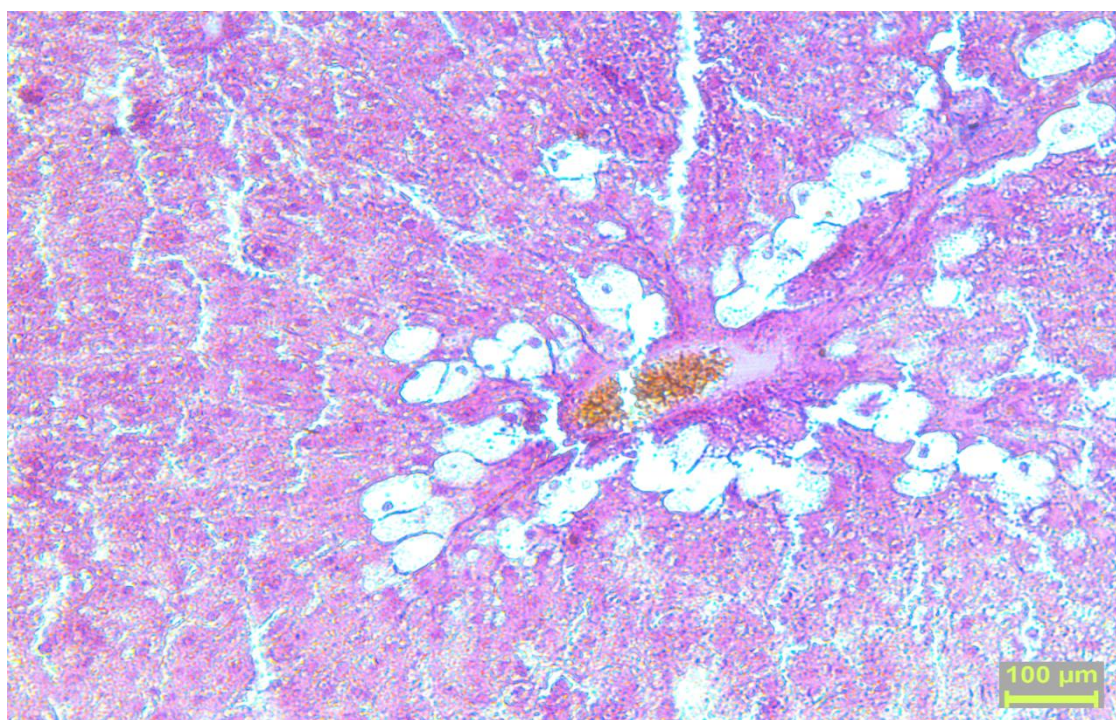


Рисунок 44 - Печень поросенка. Очаговая гидропическая дистрофия, Балочная структура нарушена. Умеренно выраженная гиперемия сосудов. ГЭ х 300

В результате для восстановления работы гепатобилиарной системы нами были назначены гепатопротекторные препараты, предназначенные для нормализации функции печени при её поражениях и ускорения регенерации функциональной активности гепатоцитов.

Таблица 66 - Гематологические показатели крови поросят до лечения

№ п/п	Показатели	Ед, изм,	Норма	1 группа (n=14)	2 группа (n=14)	3 группа (n=14)	4 группа (n=14)	Фон (n=248)
1.	WBC	$\times 10^9/L$	11 - 22	28,8 \pm 4,2	26,3 \pm 4,95	25,9 \pm 2,73	25,6 \pm 2,07	17,8 \pm 4,6
2.	LYM	$\times 10^9/L$	3,8-16,5	16,8 \pm 2,5	12,5 \pm 1,91	13,2 \pm 1,83	13,3 \pm 1,78	10,8 \pm 2,6
3.	MID	$\times 10^9/L$	0 - 3	5,7 \pm 1,7	3,2 \pm 0,51	3,8 \pm 0,58	3,6 \pm 0,52	2,3 \pm 0,1
4.	GRA	$\times 10^9/L$	2 - 15	6,3 \pm 1,8	10,6 \pm 2,56	8,9 \pm 2,3	8,7 \pm 0,84	4,7 \pm 1
5.	LYM	%	35-75	60,4 \pm 3,2	49,8 \pm 2,14	53,1 \pm 18,18	54 \pm 77,07	60,8 \pm 8,7
6.	MID	%	0 - 15	21,2 \pm 5,1	13 \pm 2,13	15,7 \pm 5	15,1 \pm 4,73	12,7 \pm 2,5
7.	GRA	%	20 - 70	18,4 \pm 5	37,2 \pm 3,02	31,2 \pm 8,64	30,9 \pm 2,74	26,5 \pm 2,2
8.	RBC	$\times 10^{12}/L$	5 – 9,5	6,62 \pm 0,87	6,46 \pm 0,59	6,83 \pm 0,58	6,84 \pm 1,15	8,83 \pm 1,5
9.	HGB	g/L	99 – 165	78 \pm 18,14	89 \pm 14,52	93 \pm 11,48	78 \pm 13,78	107 \pm 7
10.	MCHC	g/L	300 – 380	265 \pm 32,65	242 \pm 75,06	255 \pm 2,09	234 \pm 21,49	252 \pm 22,6
11.	MCH	Pg	17 – 22	11,8 \pm 4,08	11,9 \pm 1,79	11,8 \pm 0,38	11,4 \pm 0,92	12,1 \pm 1,1
12.	MCV	Fl	51 – 68	44,4 \pm 9,36	49 \pm 3,89	46,3 \pm 1,18	48,8 \pm 5,13	48 \pm 3,4
13.	RDW-CV	%	14- 19	22 \pm 1,57	18,8 \pm 6,97	22,7 \pm 1,71	21,5 \pm 4,22	20,7 \pm 1,1
14.	RDW-SD	Fl	35 – 56	48,8 \pm 3,87	46,2 \pm 9,88	52,6 \pm 2,65	52,4 \pm 7,51	49,6 \pm 6,4
15.	HCT	%	32 – 50	29,4 \pm 10,51	36,8 \pm 8,87	36,4 \pm 3,21	33,4 \pm 5,01	42,4 \pm 2,3
16.	PLT	$\times 10^9/L$	200- 700	628 \pm 105,39	913 \pm 10,05	633 \pm 87,34	797 \pm 138,73	380 \pm 21,4
17.	MPV	Fl	6 – 12	6,1 \pm 0,8	5,6 \pm 2,37	6,1 \pm 0,9	6 \pm 1,55	5,8 \pm 5
18.	PDW	Fl	10 – 18	8,5 \pm 2,58	2,7 \pm 3,59	9,7 \pm 0,43	2,8 \pm 2,66	3,2 \pm 2,8
19.	PCT	%	0,1 – 0,5	0,328 \pm 0,11	0,509 \pm 0,07	0,386 \pm 0,15	0,478 \pm 0,15	0,221 \pm 0,06
20.	P-LCR	%	13 - 43	18 \pm 10,52	24,7 \pm 3,2	25,9 \pm 8,14	14,1 \pm 4,47	17,4 \pm 4,8

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10),

Таблица 67 - Биохимические показатели сыворотки крови поросят до лечения

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	Норма	1 группа (n=14)	2 группа (n=14)	3 группа (n=14)	4 группа (n=14)	Фон (n=248)
1.	АЛТ	Е/л	22-47	71,93±5,22*	69,66±5,16*	77,41±8,42*	72,16±7,99*	39,91±3,35
2.	АСТ	Е/л	15-55	72,49±7,06*	70,78±7,82*	70,32±7,29*	71,71±3,71*	40,61±3,32
3.	ГГТП	Е/л	до 22	27,86±1,11*	27,69±1,86*	28,34±3,05*	28,88±2,94*	12,35±0,53
4.	Щелочная фосфатаза	Е/л	до 176	309,68±32,25*	316,87±30,67*	323,26±31,85*	320,05±19,83*	93,15±10,23
5.	Биллирубин общий	мкмоль/л	0,3-8,2	13,19±1,39*	12,66±1,38*	14,17±1,27*	13,54±0,81*	6,38±0,73
6.	Биллирубин прямой	мкмоль/л	0	1,31±0,1*	1,44±0,16*	1,28±0,14*	1,63±0,09*	0
7.	Глюкоза	ммоль/л	3,7-6,4	2,63±0,29*	2,9±0,29*	2,29±0,26*	2,51±0,25*	4,42±0,43
8.	Белок общий	г/л	60-83	51,08±4,84*	52,23±1,93*	53,69±2,21*	52,77±1,13*	77,33±6,59
9.	Альбумин	г/л	23-40	20,15±0,82*	22,1±1,69*	19,18±0,39*	20,09±1,33*	33,26±3,71
10.	Глобулин	г/л	39-60	30,93±1,12*	30,13±1,21*	34,51±1,42*	32,68±1,52*	44,07±2,52
11.	Железо	мкмоль/л	13-41	20,57±1,56	21,86±1,93	20,03±2,24	21,85±1,37	21,45±2,55
12.	ОЖСС	мкмоль/л		128,11±12,33	129,76±10,94	127,26±15,98	125,04±9,81	134,56±12,25
13.	НЖСС	мкмоль/л		114,69±6,46	116,92±6,43	106,4±9,02	108,7±7,35	114,7±7,78

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10),

В результате проведенных исследований установлено, что при лечении поросят, больных токсической гепатодистрофией гепатопротекторными препаратами клинические симптомы болезни у 30 % больных животных исчезали в течение пяти, а у 70% - шести суток с момента с момента начала лечения. Терапевтическая эффективность во всех группах животных составила 100%.

Наряду с этим, при анализе гематологических показателей крови на 14 е сутки эксперимента установлено (таблица 68), что положительная динамика развивается во всех группах животных.

Так количество лейкоцитов периферической крови достигло физиологических значений во всех группах животных.

При анализе показателей красной крови на 14 сутки эксперимента установлено незначительное увеличение количества эритроцитов в периферической крови животных всех опытных групп.

Отмечалась положительная динамика концентрации гемоглобина во всех опытных группах животных, однако он не достигал физиологической нормы через 14 суток после назначения терапевтических мероприятий. Вместе с этим, у животных которым назначали препарат «СилимаринКС» концентрация гемоглобина была достоверно выше чем в остальных опытных группах.

Гематокритный показатель в первой, второй и третьей группе животных хотя и повысился относительно первоначальных значений, все же оставался ниже физиологических границ. Тогда как в 3 группе поросят, которым с терапевтической целью назначали силимарин конъюгированный с наночастицами селена данный показатель находился на нижней границе нормы.

Таблица 68 - Гематологические показатели крови поросят через 14 суток после назначения терапевтических мероприятий

№ п/п	Показатели	Ед, изм,	Норма	1 группа (n=14)	2 группа (n=14)	3 группа (n=14)	4 группа (n=14)	Фон (n=248)
1.	WBC	$\times 10^9/L$	11 - 22	19,4 \pm 4,66	18,5 \pm 2,21	18,9 \pm 4,04	21,9 \pm 4,83	17,8 \pm 4,6
2.	LYM	$\times 10^9/L$	3,8-16,5	11,9 \pm 0,49	12 \pm 0,75	13,1 \pm 0,49	14 \pm 1,33	10,8 \pm 2,6
3.	MID	$\times 10^9/L$	0 - 3	5,2 \pm 0,08	4,7 \pm 0,19	4,3 \pm 0,09	4,5 \pm 0,33	2,3 \pm 0,1
4.	GRA	$\times 10^9/L$	2 - 15	2,3 \pm 4,08	1,8 \pm 1,77	1,5 \pm 3,53	3,4 \pm 3,17	4,7 \pm 1
5.	LYM	%	35-75	61,3 \pm 5,59	64,6 \pm 7,15	69,2 \pm 5,5	65,8 \pm 6,79	60,8 \pm 8,7
6.	MID	%	0 - 15	26,9 \pm 2,92	25,2 \pm 1,11	22,6 \pm 2,6	21,7 \pm 1,32	12,7 \pm 2,5
7.	GRA	%	20 - 70	11,8 \pm 7,57	10,2 \pm 7,63	8,2 \pm 7,19	12,5 \pm 7,07	26,5 \pm 2,2
8.	RBC	$\times 10^{12}/L$	5 – 9,5	7,6 \pm 0,9*	7,5 \pm 1,86*	7,86 \pm 0,69*	7,35 \pm 0,65*	8,83 \pm 1,5
9.	HGB	g/L	99 – 165	82 \pm 4,5*	86 \pm 5,47*	95 \pm 4,25*	87 \pm 7,13*	107 \pm 7
10.	MCHC	g/L	300 – 380	270 \pm 15,7	270 \pm 11,42	277 \pm 34,22	273 \pm 25,1	252 \pm 22,6
11.	MCH	Pg	17 – 22	10,8 \pm 1,1**	13,3 \pm 0,82	13,9 \pm 3,22	11,8 \pm 1,23**	12,1 \pm 1,1
12.	MCV	fl	51 – 68	40 \pm 3,3	49,2 \pm 1,13	50,1 \pm 4,08	43,3 \pm 1,62	48 \pm 3,4
13.	RDW-CV	%	14- 19	24,1 \pm 2,5	22,7 \pm 1,2	22,3 \pm 0,85	24,5 \pm 0,92	20,7 \pm 1,1
14.	RDW-SD	fl	35 – 56	48,1 \pm 4,6	55,9 \pm 3,58	55,8 \pm 2,87	53 \pm 3,48	49,6 \pm 6,4
15.	HCT	%	32 – 50	30,4 \pm 2,9	31,8 \pm 3,93	34,3 \pm 4,44	31,8 \pm 4,35	42,4 \pm 2,3
16.	PLT	$\times 10^9/L$	200- 700	401 \pm 11,6	298 \pm 60,81	265 \pm 167,25	327 \pm 91,64	380 \pm 21,4
17.	MPV	fl	6 – 12	5,7 \pm 1,3	6,2 \pm 0,48	5 \pm 1,07	14,6 \pm 0,22	5,8 \pm 5
18.	PDW	fl	10 – 18	2,4 \pm 0,5	8,2 \pm 1,05	2,7 \pm 2,82	20 \pm 0,55	3,2 \pm 2,8
19.	PCT	%	0,1 – 0,5	0,229 \pm 0,03	0,185 \pm 0,04	0,133 \pm 0,17	0,779 \pm 0,08	0,221 \pm 0,06
20.	P-LCR	%	13 - 43	26,1 \pm 3,8	17 \pm 5,34	21 \pm 9,58	18,9 \pm 2,59	17,4 \pm 4,8

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10),

При анализе биохимических показателей сыворотки крови поросят установлено (таблица 69), достоверное снижение активности ферментов переаминирования во всех группах животных. Хотя стоит отметить, что физиологических значений данные показатели не достигали. Данный факт указывает на стабилизацию клеточных мембран гепатоцитов под воздействием гепатопротекторных препаратов. Вместе с этим, отмечается положительная динамика активности ферментов холестаза. Так активность гаммаглутамилтранспептидазы снизилась во всех группах поросят вдвое, до физиологических значений. Тогда как активность щелочной фосфатазы у всех животных была хотя и выше референсных значений, но при этом ниже первоначальных показателей в 1,5 раза.

Вместе с этим отмечалось достоверное повышение общего белка и его фракций в сыворотке крови. Так уровень общего белка в сыворотке крови всех опытных групп поросят достиг референсных значений, кроме второй опытной группы, которым в качестве гепатопротекторного препарата назначали водно-дисперсионный раствор силимарина. Концентрация альбумина во всех группах поросят достоверно увеличилась и достигла физиологической нормы. Данный факт указывает на восстановление альбуминсинтезирующей функции гепатоцитов.

Кроме того, положительная динамика прослеживается и в отношении пигментного обмена в печени. Так концентрация общего билирубина достоверно снизилась относительно первоначальных значений, хотя и оставалась выше физиологической нормы в первой, второй и четвертой группе поросят. В третьей опытной группе концентрация общего билирубина соответствовала верхней границе референсных значений. Уровень прямого билирубина после применения гепатопротекторных препаратов достиг физиологической норма и в сыворотке крови доступными нам методами не идентифицировался.

Таблица 69 - Биохимические показатели сыворотки крови поросят через 14 суток после назначения терапевтических мероприятий

№ п/п	Показатели	Ед. изм.	Норма	1 группа (n=14)	2 группа (n=14)	3 группа (n=14)	4 группа (n=14)	Фон (n=248)
1.	АЛТ	Е/л	22-47	60,98±4,02*	60,71±6,36*	55,12±5,27*	57,98±4,92*	39,91±3,35
2.	АСТ	Е/л	15-55	63,39±5,13*	69,54±5,56*	60,65±5,11*	62,31±3,55*	40,61±3,32
3.	ГГТП	Е/л	до 22	10,39±0,67*	12,06±1,15*	9,44±0,96*	11,73±0,68*	12,35±0,53
4.	Щелочная фосфатаза	Е/л	до 176	200,24±19,55*	223,78±22,5*	189,03±15,35*	196,95±23,54*	93,15±10,23
5.	Билирубин общий	мкмоль/л	0,3-8,2	9,54±0,95*	8,6±0,14*	8,04±0,77*	9,4±0,74*	6,38±0,73
6.	Билирубин прямой	мкмоль/л	0	0	0	0	0	0
7.	Глюкоза	ммоль/л	3,7-6,4	3,12±0,26*	3,33±0,21*	3,63±0,37*	3,37±0,26*	4,42±0,43
8.	Белок общий	г/л	60-83	60,8±3,88*	57,35±5,32*	63,4±6,43*	61,37±2,31*	77,33±6,59
9.	Альбумин	г/л	23-40	24,54±2,53*	23,04±2,84*	26,01±2,12*	25,13±2,73*	33,26±3,71
10.	Глобулин	г/л	39-60	36,26±3,12*	34,35±2,21*	37,39±3,42*	36,24±4,52*	44,07±2,52
11.	Железо	мкмоль/л	13-41	22,88±2,2	22,21±0,79	22,11±2,27	22,57±2,52	21,45±2,55
12.	ОЖСС	мкмоль/л		132,59±5,17	123,71±6,37	133,57±5,37	125,58±10,44	134,56±12,25
13.	НЖСС	мкмоль/л		106,1±10,93	110,41±9,88	115,63±9,37	111,48±14,64	114,7±7,78

Широко известно, что одной из составляющих патогенеза при заболеваниях печени, является высокая интенсивность реакций перекисного окисления липидов и снижение напряжённости антиоксидантной защиты. Поэтому для коррекции нарушений гепатобилиарной целесообразно использование антиоксидантных препаратов. (Н.К. Хлебус, 2011.). Учитывая тот факт, что силимарин входящий в состав разработанных нами препаратов обладает ярко выраженными антиоксидантными свойствами, целесообразно оценить динамику изменений показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы защиты (таблица 70).

Таблица 70 - Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы защита крови поросят

Сроки исследований	1 контрольная (n=14)	2 опытная (n=14)	3 опытная (n=14)	4 опытная (n=14)	Фон (n=248)
	МДА, нмоль/л				
До лечения	15,7±1,77*	14,99±1,78*	16,94±2,07*	14,88±1,9*	3,24±0,29
Через 14 суток	17,68±1,79	15,54±2,12	16,17±1,96	16,12±1,73	18,22±1,97
	Глутатионпероксидаза, мкмоль G-SH /л x мин				
До лечения	7,68±1,06*	8,96±1*	3,41±0,46	9,56±0,94*	3,24±0,29
Через 14 суток	16,63±1,77	16,54±1,81	21,43±1,98**	15,23±1,84	18,22±1,97

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной группой и фоновыми значениями, ** между опытными группами животных ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10),

Так в ходе исследований данных показателей установлено достоверное снижение концентрации малонового диальдегида до фоновых значений в третьей группе животных которым назначали препарат силимарина конъюгированного с коллоидным селеном. Тогда как в остальных группах животных хотя и наблюдалась положительная динамика, данный показатель оставался достоверно выше фоновых значений. Данный факт указывает на сочетанное действие силимарина и селена входящего в состав препарата.

Вместе с этим активность глутатионпероксидазы во всех группах животных не имела достоверных отличий от фоновых животных, что как уже говорилось является следствием включения компенсаторных механизмов в организме животных. Однако, в третьей опытной группе к концу эксперимента активность данного показателя была выше как опытных групп, так и фоновых значений. Что

указывает на включение селена содержащегося в препарате в метаболический цикл антиоксидантной системы организма животных.

Таким образом, достоверно установлено, что парентеральное применение с терапевтической целью препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц приводит к восстановлению функциональной активности печени у поросят при токсической гепатодистрофии.

Вместе с этим, препарат силимарина на основе коллоидного селена наряду ярко выраженными гепатопротекторными свойствами, проявил выраженное антиоксидантное действие, в результате чего активнее осуществляются регенеративные процессы и связывание токсических веществ.

3.2.7 Комплекс лечебно-профилактических мероприятий патологий гепатобилиарной системы у животных с применением разработанных препаратов, а также препаратов, стимулирующих процесс регенерации и витаминных кормовых добавок

Учитывая тот факт, что при патологии гепатобилиарной системы происходят глубокие нарушения всех видов обменных процессов в организме животных и как следствие снижение иммунитета, нарушение кроветворной системы (о чем говорилось выше), а все это даже после назначения гепатопротекторных средств и восстановления функциональной активности органа ведет к достаточно длительному реабилитационному периоду, и как следствие длительному восстановлению продуктивных качеств животных.

Поэтому на следующем этапе нашей работы нами проведена апробация новой мицеллярной инъекционной формы на основе метилурацила в разработке которого мы принимали непосредственное участие. А также витаминной кормовой добавки «Волстар» в схеме лечения токсической дистрофии печени у поросят (в разработке которого мы также принимали участие).

В данном случае нас заинтересовал тот факт, что метилурацил приводит к выраженной синхронизации всех процессов, организующих пролиферацию клеток печени при этом не как инициатор, а как ускоритель клеточного деления

только в поврежденном органе. Принципиальным является тот факт, что метилурацил не проявляет свое поливалентное воздействие, в том числе анаболическое, на здоровый орган.

Метилурацил по своему строению относят к производным пириимидина. Препараты на основе метилурацила ускоряют процессы клеточной регенерации, стимулируют клеточный и гуморальный иммунитет, ускоряют заживление ран. Метилурацил также оказывает противовоспалительное действие.

Данный препарат обладает поистине уникальными лечебными свойствами - его назначают в качестве лечения агранулоцитарной анемии, алиментарно-токсической анемии, при хроническом бензолном отравлении, лейкопении, злокачественных новообразованиях, при радиотерапии и других состояниях, сопровождающихся лейкопенией. Имеются также данные об эффективности метилурацила при лечении ожогов и переломах костей, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, хроническом гастрите, панкреатите и гепатитах. Этот терапевтический эффект связан с нормализацией нуклеинового обмена в слизистой оболочке.

По имеющимся литературным данным терапевтическая эффективность метилурацила при бронхопневмонии рогатого скота практически не уступает бициллину-3 и норсульфазолу.

Препараты на основе метилурацила в настоящее время предоставлены на фармацевтическом рынке в трех формах: таблетированной, в виде свечей (суппозитории) и в форме мазей ("Левомеколь" и "Левосин"). Метилурацил также входит в состав препаратов амиглурацил, диоксиколь, неогелазоль.

В ветеринарной практике применение метилурацила в виде таблеток не получило широкого применения, что обусловлено его низкой биологической доступностью из-за слабой растворимости, а также сложностью (трудоёмкостью) введения препарата *per os*.

Имеются единичные публикации, посвящённые применению метилурацила, как препарата, стимулирующего иммунную систему крупного рогатого скота (О.А. Макарян, 1971). При проведении исследований препарат применяли в виде

0,9% водной суспензии которую вводили внутривенно. Но несмотря на высокую терапевтическую эффективность препарата, установленную автором при лечении бронхопневмоний рогатого скота, производственного масштаба данные рекомендации не получили. Что связано со сложностью приготовления и нестабильностью водного раствора (суспензии) метилурацила, а также трудоёмкостью внутривенного введения.

Таким образом, несмотря на столь широкий спектр активности и низкую стоимость субстанции метилурацила, его основным недостатком является слабая растворимость в воде и органических растворителях (до 0,9%), что и обуславливает отсутствие инъекционных препаратов на его основе.

В этой связи нами разработана новая водорастворимая лекарственная форма метилурацила.

Наряду с этим, существенным является тот факт, что печень является депо жирорастворимых витаминов. В этой связи у животных с различными заболеваниями печени широко распространены микроэлементозы и гиповитаминозы, что усугубляет течение основного заболевания. Комплексная терапия патологий печени должна включать в себя и коррекцию недостатка витаминов, а также микро - и макроэлементов, что способствует нормализации обмена веществ, улучшению регенерации ткани в печени и повышение общей резистентности организма.

Поэтому нами была разработана стабильная водорастворимая сбалансированная комбинация основных витаминов и селена, содержащая: витамины А, D3, Е, С, ДАФС-25 и вспомогательные компоненты (полисорбат-80, 2-пирролидон, спирт бензиловый и дистиллированную воду). Разработанный препарат представляет сбалансированную комбинацию основных витаминов и селена. В 1 мл препарата содержится: витамина А – 50000 МЕ; витамина D3 – 200 МЕ, Е – 30 мг, С – 100 мг, ДАФС-25-0,3 мг. Препарат представляет собой прозрачную, опалесцирующую жидкость от светло-желтого до желтого цвет, хорошо смешивающуюся с водой.

3.2.7.1 Безопасность применения витаминно-минеральной кормовой добавки пороссятам отъемного периода

Целью данного исследования явилось изучение переносимости и безопасности орального применения витаминно-минеральной кормовой пороссятам.

Клиническое испытание, апробацию и внедрение витаминно-минеральной кормовой добавки «ВолСтар» проводили в период 01.08.13 по 30.10.13 гг. в учхозе РГАУ-МСХА «Муммовское» Аткарского района Саратовской области. Объектами исследований являлись 60 клинически здоровых пороссят, подобранных по принципу аналогов (порода «крупная белая», в возрасте 3 месяцев. Средняя живая масса животных составляла 26-27 кг.

Было сформировано две опытных и одна контрольная группы по 20 голов в каждой. Витаминно-минеральную кормовую добавку «ВолСтар» применяли согласно инструкции по применению (перорально с питьевой водой, индивидуальным и групповым методом 1 раз в день в течение 5 дней). В качестве препарата сравнения применяли препарат «Нитаминол» перорально с питьевой водой 1 раз в день в течение 5 дней.

Витаминно-минеральную кормовую добавку «ВолСтар» вводили животным орально в следующих дозировках:

1. Животным первой группы (n=20) витаминно-минеральную кормовую добавку «ВолСтар» давали внутрь в суточной дозе 0,5 мл на 10 кг живой массы.
2. Животным второй группы (n=20) препарат давали в суточной дозе 1 мл на 10 кг живой массы.
3. Животным контрольной группы вводился препарат сравнения «Нитаминол» из расчёта 1 мл на 10 кг живой массы.

Продолжительность наблюдений за пороссятами составила 30 дней. Для оценки эффективности применяемых препаратов проводили клинико-лабораторные исследования данных животных. До и по окончании эксперимента проводили взвешивание животных. Через 30 суток от начала эксперимента у всех животных брали кровь для лабораторных исследований (таблица 71).

Таблица 71 - Схема титрации доз и кратности применения витаминно-минеральной кормовой добавки «Волстар» и препарата сравнения «Нитами́н»

Группа животных	Препарат	Доза препарата	Кратность применения	Контролируемые параметры
1 опытная	«ВолСтар»	0,5 мл/10 кг (n = 20)	1 р/д	Результаты клинического осмотра животных, лабораторного исследования крови.
2 опытная	«ВолСтар»	1 мл/10 кг (n = 20)	2 р/д	
Контрольная	«Нитами́н»	1 мл/10 кг (n = 20)	2 р/д	

Результаты общего анализа крови и биохимического исследования крови поросят до проведения терапевтических мероприятий изложены в данных таблицы 72-73.

Таблица 72 – Усреднённые данные результатов общего анализа крови поросят до проведения терапевтических мероприятий

Показатели	Ед. изм.	Группа 1	Группа 2	Контроль	Норма
		M±m	M±m	M±m	
WBC	x10 ⁹ /L	17,54±4,68	20,6±2,09	20,7±2,86	11 - 22
LYM	x10 ⁹ /L	11,18±3,24	12±0,85	13,7±1,16	3.8-16.5
MID	x10 ⁹ /L	2,24±0,75	2,6±0,64	2,5±0,73	0 - 3
GRA	x10 ⁹ /L	4,12±1,39	6±1,3	4,5±0,42	2 - 15
LYM	%	64,03±5,38	59,8±1,25	67,6±2,81	35-75
MID	%	13,13±3,64	13,6±0,49	12,6±1,19	0 - 15
GRA	%	22,84±4,91	26,6±3,76	19,8±1,01	20 - 70
RBC	x10 ¹² /L	6,6±0,61	6,39±0,01	7±0,6	5 – 9,5
HGB	g/L	102,6±11,82	100±3,54	116±4,16	99 – 165
MCHC	g/L	278,4±11,06	278±2,83	277±11,26	300 – 380
MCH	Pg	15,52±0,83	15,7±0,49	16,6±0,61	17 – 22
MCV	Fl	55,8±3,51	56,2±1,2	59,8±1,66	51 – 68
RDW-CV	%	17,98±2,53	20±1,48	18,6±0,72	14- 19
RDW-SD	Fl	49,81±4,02	56,2±2,9	55,5±1,45	35 – 56
HCT	%	37±5,24	35,9±1,22	41,9±1,74	32 – 50
PLT	x10 ⁹ /L	547,5±129,15	517±12,03	444±4,08	200- 700
MPV	Fl	7,83±0,9	8,4±0,07	8,8±1	6 – 12
PDW	Fl	10,39±1,36	11,5±0,14	10,5±1,73	10 – 18
PCT	%	0,43±0,1	0,437±0,04	0,392±0,08	0,1 – 0,5

Таблица 73 - Усреднённые данные результатов биохимического исследования крови поросят до проведения терапевтических мероприятий

Показатели	Ед. изм.	Группа 1	Группа 2	Контроль	Норма
		M±m	M±m	M±m	
АЛТ	Е/л	43±1,8	41±1,52	44±2,6	до 47
АСТ	Е/л	53±1,4	51±1,29	54±1,5	до 55
Амилаза	Е/л	68±3,02	57±2,13	50±4,04	до 88
Глюкоза	ммоль/л	2,69±0,04	1,99±0,73	1,54±0,52	3,7-6,4
Креатинин	ммоль/л	171,8±6	159±12,65	152,4±11,53	70-208
Мочевина	ммоль/л	4,5±0,5	5,3±0,53	4,6±0,03	3,5-5,8
Щелочная фосфатаза	Е/л	136±10,1	104±12,08	148±11,68	до 176
Белок	г/л	53,2±1,2	54,1±2,8	51,7±2,82	60-83
Альбумин	г/л	16,1±1,9	16,8±1,52	15,6±1,06	22,6-40,4
Глобулин	г/л	37,1±1,6	37,3±1,31	36,1±1,9	39,5-60

Результаты общего анализа крови и биохимического исследования крови поросят после проведения терапевтических мероприятий изложены в данных таблицы 74-75.

Таблица 74 – Усреднённые данные результатов общего анализа крови поросят после проведения терапевтических мероприятий

Показатели	Ед. изм.	Группа 1	Группа 2	Контроль	Норма
WBC	x10 ⁹ /L	17±1,32	13,3±1,09	18,8±1,86	11 - 22
LYM	x10 ⁹ /L	10,3±1,88	8,1±0,85	14,1±1,16	3.8-16.5
MID	x10 ⁹ /L	2,5±1,08	1,6±0,64	1,8±0,73	0 - 3
GRA	x10 ⁹ /L	4,2±0,17	3,6±1,3	2,9±1,42	2 - 15
LYM	%	60,6±1,66	60,7±1,25	74,8±2,81	35-75
MID	%	14,5±1,55	11,8±0,49	9,3±7,19	0 - 15
GRA	%	24,9±1,24	27,5±3,76	15,9±1,01	20 - 70
RBC	x10 ¹² /L	6,85±0,86	7,28±0,01	7,33±0,6	5 – 9,5
HGB	g/L	110±3,33	114±2,54	116±4,16	99 – 165
MCHC	g/L	276±6,46	278±2,83	266±1,26	300 – 380
MCH	Pg	16,1±1,36	15,7±0,49	15,8±0,61	17 – 22
MCV	fl	58,1±1,19	56,2±1,2	59,6±1,66	51 – 68
RDW-CV	%	18,6±3,09	18,5±1,48	15,3±0,72	14- 19
RDW-SD	fl	54,1±3,93	52±2,9	45,7±2,45	35 – 56
HCT	%	39,8±1,58	41±1,22	43,7±1,74	32 – 50
PLT	x10 ⁹ /L	437±29,15	472±2,03	469±7,08	200- 700
MPV	fl	9,7±0,9	8,2±0,07	8,3±1	6 – 12
PDW	fl	13,7±1,36	10,7±0,14	9,8±0,73	10 – 18
PCT	%	0,423±0,1	0,4±0,04	0,4±0,08	0,1 – 0,5

Таблица 75 - Усреднённые данные результатов биохимического исследования крови поросят после проведения терапевтических мероприятий

Показатели	Ед. изм.	Группа 1	Группа 2	Контроль	Норма
АЛТ	Е/л	39±3,81	36±1,86	38±2,18	до 47
АСТ	Е/л	43±1,43	39±2,08	41±1,67	до 55
Амилаза	Е/л	76±1,32	81±2,36	74±3,46	до 88
Глюкоза	ммоль/л	4,02±0,11	5,12±0,89	4,88±0,84	3,7-6,4
Креатинин	ммоль/л	109,8±4,67	144±5,14	137±8,92	70-208
Мочевина	ммоль/л	4,8±0,78	5,3±0,19	4,8±0,15	3,5-5,8
Щелочная фосфатаза	Е/л	109±3,58	134±6,34	156±4,98	до 176
Белок	г/л	63,9±1,89	76,5*±2,21	64,1±2,46	60-83
Альбумин	г/л	23,7±1,21	32,9*±1,46	24,3±1,12	22,6-40,4
Глобулин	г/л	40,2±1,43	43,6±1,56	39,8±1,34	39,5-60

В ходе эксперимента установлено, что через 30 дней от начала эксперимента отмечается достоверное повышение общего белка у поросят всех групп, в основном за счет альбуминовой фракции. Это указывает на повышение усвоения питательных веществ корма. Данный факт подтверждается повышением концентрации глюкозы в сыворотке крови поросят, что также свидетельствует о нормализации углеводного метаболизма в организме животных. Вместе с этим наиболее интенсивная динамика изменений данных показателей отмечается во второй опытной группе животных. Наряду с этим установлено (таблица 76), что сохранность поросят и в контроле, и в опытных группах составила 100%. Наибольший среднесуточный прирост поросят наблюдается во второй опытной группе поросят.

Таблица 76 - Показатели продуктивности поросят

Показатели	Группы поросят		
	Группа 1	Группа 2	Контроль
Количество животных в начале опыта, гол	20	20	20
в конце опыта, гол	20	20	20
Масса поросят - в начале опыта, кг	26,4±1,8	26,7±1,3	27,1±1,2
- в конце опыта, кг.	38,23±1,20	39,26±1,4	38,93±1,6
Среднесуточный прирост, г	394,2±3,86	418,8± 3,98	394,6±4,12
Сохранность, %	100	100	100

На основании полученных результатов исследований можно заключить, что применение витаминно-минеральной добавки «Волстар» в дозировке 0,5-1 мл на 10 кг живой массы способствует нормализации обмена веществ у поросят, а также повышению жизнеспособности молодняка и увеличению продуктивности.

3.2.7.2 Безопасность применения водно-дисперсионного раствора метилурацила «Иммуносейв» поросятам отъемного периода

Целью данного исследования явилась характеристика стимулирующего действия фармакологического вещества на основе метилурацила при его внутримышечном введении, и выявление его положительного влияния на основные физиологические функции организма поросят.

Предметом исследования были поросята-отъемыши, которых идентифицировали и оценивали в отношении переменной исследования на индивидуальной основе.

Все животные подвергались комплексному обследованию, которое включало в себя клиническое и лабораторное исследование.

Исходя из полученных в ходе выше указанных исследований результатов, проводили формирование групп по сходным физиологическим показателям.

В исследование были включены 16 клинически здоровых поросят-отъемышей (в возрасте от 2 мес. живой массой от 12,0 до 14,0 кг).

Критерием отбора в группу для исследований являлось масса и возраст поросят-отъемышей.

После включения в исследование животных взвешивали и сформировали на основе полученных данных 4 группы: контрольную и 3 опытных.

Дизайн и организация исследования направлены на решение поставленной цели и базируются на общих принципах организации исследований по определению лечебно-профилактических свойств лекарственных препаратов (Таблица 77).

Таблица 77 - Дизайн эксперимента по определению лечебно-профилактической эффективности инъекционной формы препарата «Иммуно-сейв»

Группа	Животные (терапия)	Способ применения, доза	Объем, мл	Курс (дни)	Общее количество животных
1	Опытная группа (Исследуемый препарат «Иммуно-сейв»)	Внутримышечно 2 мг/кг	1,2-1,4	однократно	4
2	Опытная группа (Исследуемый препарат «Иммуно-сейв»)	Внутримышечно 4 мг/кг	2,4-2,8	однократно	4
3	Опытная группа (Исследуемый препарат «Иммуно-сейв»)	Внутримышечно 6 мг/кг	3,6-4,2	однократно	4
4	Контрольная группа (терапия не проводилась)				

При оценке лечебно-профилактической эффективности испытуемый препарат вводили внутримышечно в среднюю треть шеи животного.

При выборе доз мы руководствовались результатами, полученными при исследовании острой токсичности препарата «Иммуно-сейв», а также предполагаемыми максимальными суточными дозами, в которых фармакологическое вещество будет рекомендовано для клинического изучения.

Для проведения эксперимента было сформировано по принципу аналогов 4 группы поросят-отъемышей, массой 12-14 кг, по 4 головы в каждой. Животным 1 группы внутримышечно однократно вводили препарат «Иммуно-сейв» в дозе 2 мг/кг по действующему веществу, что соответствовало минимальной терапевтической дозе, рекомендуемой для клинических испытаний. Животным 2-ой группы препарат вводили однократно, в дозе 4 мг/кг по действующему веществу, что соответствовало средней терапевтической дозе, рекомендуемой для клинических испытаний. Животным 3-ой группы препарат вводили однократно, в дозе 6 мг/кг по действующему веществу, что соответствовало максимальной терапевтической дозе, рекомендуемой для клинических испытаний.

Животным контрольной группы, при тех же условиях содержания и кормления, вводили равный объем 0,9% раствора натрия хлорида из расчета максимального объема вводимого вещества, что соответствует 3 группе животных или 0,3 мл/кг.

В течение эксперимента за животными вели наблюдение, учитывали клиническое состояние, активность, потребление корма и воды.

Опытных и контрольных животных взвешивали перед введением препарата, а также на 7, 14 и 62 сутки после введения препарата; определяли относительный привес по отношению к исходной массе тела (%).

Кровь для биохимических исследований брали по 1-2 мл в вакуумные пробирки для *in vitro* диагностики «Improvacuter» (Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd, China) с использованием тромбина в качестве активатора сгустка. Для гематологических исследований – в вакуумные пробирки PUTH 3 мл с КЗ ЭДТА 13x75 для *in vitro* диагностики «Improvacuter» (Guangzhou Improve Medical Instruments Co. Ltd, China). Взятие крови производили из яремной вены. Предварительно по ходу вен дезинфицировали кожу 70⁰ раствором этиловым спиртом.

Для получения сыворотки пробы центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин.

Исследование морфологического состава периферической крови проводили на гематологическом анализаторе MicroCC 20 plus (США). Биохимические исследования проводили на биохимическом анализаторе «MindrayBA-88A» с использованием диагностических систем фирмы «Ольвекс диагностикум» и «Диакон ДС». Для проверки правильности и точности определения биохимических показателей в сыворотке крови, использовали контрольную сыворотку для биохимических исследований по ТУ 9398-022-09807247-2009, ООО «HOSPITEX DIAGNOSTICS».

Исследование крови и сыворотки проводили за 24 часа до начала эксперимента и на 14 сутки после первого внутримышечного введения препарата.

Для изучения системного действия препарата «Иммуно-сейв», проводили оценку основных показателей метаболизма в сыворотке крови животных, которые включали определение общего белка сыворотки крови и креатинина, глюкозы, активность основных ферментов, имеющих диагностическое значение при

нарушении функциональной активности основного органа метаболизма, печени - аспартат – и аланинаминотрансферазы, щелочная фосфатаза, билирубин.

Функциональное состояние почек оценивали, используя комплекс методов: определение уровня мочевины и креатинина в сыворотке крови.

Основным составляющим компонентом настоящих исследований была характеристика стимулирующего действия фармакологического вещества при внутримышечном введении, и выявление его положительного влияния на основные физиологические функции организма поросят.

В течение всего опыта регулярно проводили клинический осмотр животных.

В ходе клинического осмотра животных установлено, что на протяжении всего опыта животные опытных групп по внешнему виду и поведению сильно не отличались от животных контрольной группы. Клиническая картина интоксикации не выражена, гибели животных не наблюдалось.

В ходе исследования физиологических показателей поросят – отъемышей при внутримышечном введении животным препарата «Иммуно-сейв» было установлено, что гематологические показатели крови поросят контрольной группы и подопытных групп находятся в пределах физиологических границ (таблица 78). Вместе с этим достоверно установлено, что концентрация гемоглобина в крови, поросят которым однократно, внутримышечно вводили препарат «Иммуно-сейв» в дозах 4 и 6 мг/кг массы тела по действующему веществу, достоверно выше чем у контрольных животных. Кроме того, у поросят данных групп отмечается достоверная положительная динамика по данному показателю за 14 дней эксперимента. Данный факт указывает на стимулирующее действие метилурацила на кроветворную функцию костного мозга.

Таблица 78 – Гематологические показатели сыворотки поросят отъемышей после однократного внутримышечного введения препарата «Иммуносейв»

Показатели	Ед. Изм.	День эксперимента							
		За 24 часа до начала эксперимента				Через 14 дней после начала эксперимента			
		1 опытная	2 опытная	3 опытная	Контроль	1 опытная	2 опытная	3 опытная	Контроль
WBC	x10 ⁹ /L	18,5±1,88	17,8±7,42	14,8±3,32	15,3±3,93	19,5±1,72	14,8±4,16	14,6±1,26	14,6±1,26
LYM	x10 ⁹ /L	12,4±1,65	11,5±5,84	8,7±3,57	8,9±2,14	12,8±1,44	8±1,77	9,2±1,61	9,2±1,61
MID	x10 ⁹ /L	3,9±1,23	3,7±1,52	3±0,67	2,4±0,31	4,7±0,56	2,4±0,68	2,8±0,54	2,8±0,54
GRA	x10 ⁹ /L	2,3±0,84	2,6±2,14	10,5±13,02	6,6±12,49	2,1±0,79	10,8±14,17	2,6±0,5	2,6±0,5
LYM	%	66,9±6,85	65,1±14,68	44±32,94	59,1±23,5	65,7±4,87	50,5±28,96	62,9±6,76	62,9±6,76
MID	%	21±5,87	21,9±5,65	13,4±10,38	15,2±5,72	24,2±3,09	12,5±6,43	19±4,37	19±4,37
GRA	%	12,2±4,33	13,1±12,27	30,3±22,53	25,5±28,59	10,1±2,05	37,3±35,9	18,2±3,48	18,2±3,48
RBC	x10 ¹² /L	6,8±2,56	6±3,29	7,1±1,08	6,8±0,97	7±0,9	7±2,04	8±0,64	7,1±0,83
HGB	g/L	87,5±38,56	69,3±31,11	87,8±5	86,8±17,22	90±14,04	101,1±13,05*	96±3,4*	85,8±14,19
MCHC	g/L	279,3±24,35	281,5±55,07	249,8±25,13	264±46,56	272,5±8,53	313±13,09	252,5±30,9	260,5±28,13
MCH	Pg	12,8±1,24	11,9±1,46	12,5±1,73	12,3±0,6	13±1,24	18,7±2,71	12±1,16	12±0,67
MCV	Fl	45,7±5,57	42,4±4,18	50,1±4,02	48,8±2,52	47,4±3,72	58,6±4,8	47,7±2,59	48,1±2,33
RDW-CV	%	21,3±2,56	21,9±3,27	21,4±3,48	22,4±2,09	22,7±0,97	13,6±1,52	21,5±1,49	22,7±4,14
RDW-SD	Fl	48,3±4,89	46,3±4,64	53,4±7,78	53,8±2,44	53,7±4,66	38±3,36	51,3±1,26	48,4±2,58
HCT	%	31,7±14,96	25,5±14,36	35,3±4,43	34±6,09	33±4,22	36,3±12,87	38,2±4,43	35±4,56
PLT	x10 ⁹ /L	846,3±543,15	536,8±184,55	284±34,35	481,9±229,34	481±326,24	291,4±86,45	450,8±265,65	474,5±142,48
MPV	Fl	5,9±0,53	5,3±1,73	5±1,19	6,8±0,93	6,2±1,31	9,1±1,88	7,3±4,74	5,5±1,91
PDW	Fl	7,6±4,26	2,4±0,54	3,9±2,57	9,7±1,28	7±3,94	10,8±2,66	6,1±5,46	3,2±0,83
PCT	%	0,5±0,34	0,3±0,18	0,4±0,14	0,3±0,16	0,3±0,25	0,3±0,21	0,4±0,24	0,4±0,14
P-LCR	%	3±4,87	0,3±0,53	1,9±3,42	1,4±3,59	2,7±7,44	0,5±0,24	0,5±0,52	0,3±0,47

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами (P ≤ 0,05 при критическом 2,10)

Вместе с этим при анализе биохимических показателей крови (таблица 79) наблюдается достоверное повышение общего белка в 3 опытной группе поросят, которым вводили максимальную терапевтическую дозу препарата «Иммуносейв», по сравнению с контрольной группой за счет альбуминовой фракции (концентрация общего белка составила $72,5 \pm 4,2$ г/л в опытной и $62,1 \pm 6,25$ г/л в контрольных группах; концентрация альбуминов составила $30,8 \pm 1,82$ г/л в опытной и $24,4 \pm 1,52$ г/л в контрольных группах соответственно). Вместе с этим отмечается достоверное повышение альбуминов сыворотки крови во второй опытной группе относительно контрольных животных. Так концентрация альбуминов в сыворотке крови поросят-отъемышей, которым внутримышечно, однократно вводили препарат «Иммуносейв» в дозе 4 мг/кг по действующему веществу концентрация альбумина на 14 сутки эксперимента, составила $28,3 \pm 1,82$ г/л, против $24,4 \pm 1,52$ г/л в контрольной. Однако данные показатели как в опытной, так и контрольной группе не выходили за пределы физиологических значений. Что свидетельствует о положительном влиянии препарата на метаболизм белка в организме. Все остальные исследуемые нами биохимические показатели крови соответствуют физиологической норме. Наряду с этим различие в содержании остальных биохимических показателей между опытной и контрольной группой недостоверны и находились в пределах физиологических значений.

Таблица 79 – Биохимические показатели сыворотки крови поросят отъемышей после однократного внутримышечного введения препарата «Иммуносейв»

Показатели	Ед. Изм.	День эксперимента							
		За 24 часа до начала эксперимента				Через 14 дней после начала эксперимента			
		1 опытная	2 опытная	3 опытная	Контроль	1 опытная	2 опытная	3 опытная	Контроль
АЛТ	Е/л	44,5±4,82	41,8±4,17	40,9±2,89	45,2±2,8	43,9±3,42	42,9±5,89	44,7±4,32	42,9±4,97
АСТ	Е/л	43,9±3,02	44,9±5,02	44,9±3,32	46,6±5,02	46,3±5,03	46,4±3,87	45,1±2,47	44,9±4,99
Щелочная фосфатаза	Е/л	154±16,56	162,5±14,06	158,4±13,01	155,1±13,23	153,6±15,1	149,1±5,44	156,9±20,43	160±14,9
Мочевина	ммоль/л	4±0,57	4,1±0,39	4±0,18	4,1±0,35	3,9±0,29	3,9±0,4	4,1±0,26	4,2±0,33
Креатинин	ммоль/л	137,1±15,9	136,8±13,8	137,6±13,07	134,5±9,42	143,1±13,4	138,2±11,76	134,8±10,21	136,8±11,48
Билирубин	мкмоль/л	2,8±0,17	3,2±0,25	3±0,35	2,9±0,25	3±0,37	3±0,19	3,3±0,18	2,9±0,13
Белок общий	г/л	65,7±7,67	62,1±3,82	65,9±5,63	63,9±5,46	69,5±2,83	69,1±7,46	72,5±4,2*	62,1±6,25
Альбумин	г/л	24,9±3,12	23,9±2,18	25,9±1,3	24±0,91	27,3±2,3	28,3±1,82*	30,8±1,82*	24,4±1,52
Глобулин	г/л	40,8±8,86	38,1±4,72	40±4,97	39,9±4,94	42,3±1,19	40,8±8,95	41,6±4,77	37,7±7,6

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при критическом 2,10)

Результаты по динамике прироста живой массы поросят-отъемышей после однократного внутримышечного введения препарата «Иммуносейв» приведены в таблице 80.

Таблица 80 - Динамика прироста живой массы поросят в опытных и контрольной группах

№ группы	Масса в кг после введения через (суток)				Прирост за 62 дня	% к исходной массе тела
	0	7	14	62		
1	13,6±0,81	12,9±0,32	14,2±0,31	15,2±0,23	1,6±0,53	111,8±4,24*
2	13,1±0,27	12,3±0,23	13,4±0,17	14,9±0,31	1,8±0,41	113,5±3,22*
3	12,6±0,33	12,2±0,25	13,2±0,3	14,8±0,24	2,1±0,1	116,9±0,71*
4 (контрольная)	12,6±0,14	12±0,4	13,7±0,23	13,7±0,31	1,1±0,36	109±2,88*

Анализируя данные по динамике привеса поросят-отъемышей установлено, что интенсивность роста живой массы у поросят опытных групп, достоверно выше, чем у поросят в контрольной группе. Вместе с этим наиболее значимые привесы были получены в группе поросят, которым вводили препарат в дозе 6 мг/кг массы тела, относительно поросят контрольной группы (до 116,9±0,71 % к исходной массе тела в группе с дозой препарата 6 мг/кг при 109±2,88 % в контрольной).

Проведенные исследования позволяют заключить, что препарат «Иммуносейв» при однократном внутримышечном введении поросятам отъемышам в дозах 4 и 6 мг/кг живой массы стимулирует гемопоэтическую функцию организма, повышает конверсию питательных веществ корма, о чем свидетельствует повышение общего белка за счет фракции альбуминов в сыворотке крови опытных поросят относительно контроля и как следствие приводит к увеличению среднесуточных привесов относительно контроля.

3.2.7.3 Влияние препарата «Иммуносейв» на физиологические показатели телят молочного периода

Целью данного исследования явилась характеристика стимулирующего действия препарата «Иммуносейв» при его внутримышечном введении, выявление положительного влияния на основные физиологические функции организма телят

Предметом исследования были телята, которых идентифицировали и оценивали в отношении переменной исследования на индивидуальной основе.

Все животные подвергались комплексному обследованию, которое включало в себя клиническое и лабораторное исследование.

Исходя из полученных в ходе выше указанных исследований результатов, проводили формирование групп по сходным физиологическим показателям.

В исследование были включены 30 клинически здоровых телят (в возрасте от 1 до 2 мес. живой массой от 45,0 до 70,0 кг).

Критерием отбора в группу для исследований являлось масса и возраст телят.

После включения в исследование животных взвесили и сформировали 3 группы: контрольную и 2 опытных.

Дизайн и организация исследования направлены на решение поставленной цели и базируются на общих принципах организации исследований по определению лечебно-профилактических свойств лекарственных препаратов (таблица 81).

При оценке лечебно-профилактической эффективности испытуемый препарат вводили внутримышечно в область крупа.

При выборе доз мы руководствовались результатами, полученными при исследовании острой токсичности препарата «Иммуно-сейв», а также предполагаемыми максимальными суточными дозами, в которых фармакологическое вещество будет рекомендовано для клинического изучения.

Таблица 81 - Дизайн эксперимента по определению лечебно-профилактической эффективности инъекционной формы препарата «Иммуносейв»

Группа	Животные (терапия)	Способ применения	Курс (дни)	Общее количество животных
1	Контрольная группа (терапия не проводилась)	-	-	10
2	Опытная группа (Исследуемый препарат (ИММУНОСЕЙВ))	внутримышечно	Двукратно с интервалом 7 дней	10
3	Опытная группа (Исследуемый препарат (ИММУНОСЕЙВ))	внутримышечно	Двукратно с интервалом 7 дней	10

Для проведения эксперимента было сформировано по принципу аналогов 3 группы телят, массой 45 - 70 кг, по 10 голов в каждой. Животным 1 опытной группы внутримышечно двукратно с интервалом 7 дней вводили препарат «Иммуносейв» в объеме 5 мл на голову или 100 мг по действующему веществу на животное (в среднем доза составляла 1,5 мг/кг по действующему веществу, что соответствовало минимальной терапевтической дозе, рекомендуемой для клинических испытаний). Животным 2-ой группы препарат вводили двукратно с интервалом 7 дней, в объеме 10 мл на голову или 200 мг по действующему веществу на животное (в среднем доза составляла 3 мг/кг по действующему веществу, что соответствовало максимальной терапевтической дозе, рекомендуемой для клинических испытаний).

Животным контрольной группы, при тех же условиях содержания и кормления, вводили равный объем 0,9% раствора натрия хлорида (смотри выше «Контрольное вещество») из расчета максимального объема вводимого вещества, что соответствует 2 группе животных или 10 мл на голову двукратно с интервалом 7 дней.

В течение эксперимента за животными вели наблюдение, учитывали клиническое состояние, активность, потребление корма и воды.

Опытных и контрольных животных взвешивали перед введением препарата, а также на 7 и 14 сутки после первого введения препарата; определяли

относительный привес по отношению к исходной массе тела (%).

Исследование сыворотки крови проводили за 24 часа до начала эксперимента, а также на 7 и 14 сутки после первого внутримышечного введения препарата.

Для изучения системного действия препарата «Иммуно-сейв», проводили оценку основных показателей метаболизма в сыворотке крови животных, которые включали определение общего белка сыворотки крови и креатинина, глюкозы, активность основных ферментов, имеющих диагностическое значение при нарушении функциональной активности основного органа метаболизма, печени - аспарат – и аланинаминотрансферазы, щелочная фосфатаза, билирубин.

Функциональное состояние почек оценивали, используя комплекс методов: определение уровня мочевины и креатинина в сыворотке крови.

Основным составляющим компонентом настоящих исследований была характеристика стимулирующего действия фармакологического вещества при его внутримышечном введении, выявление положительного влияния на основные физиологические функции организма телят.

В течение всего опыта регулярно проводили клинический осмотр животных.

В ходе клинического осмотра животных установлено, что на протяжении всего опыта подопытные животные по внешнему виду и поведению сильно не отличались от животных контрольной группы. Клиническая картина интоксикации не выражена, гибели животных не наблюдалось.

При анализе биохимических показателей крови (таблица 82) наблюдается достоверное повышение общего белка в опытных группах телят, которым внутримышечно, двукратно с интервалом 7 дней, вводили препарат «Иммуносейв» до $73,7 \pm 4,11$ и $74,3 \pm 4,76$ г/л в первой и второй опытных группах соответственно, по сравнению с $61,4 \pm 2,43$ г/л в контрольной группе.

Таблица 82 – Биохимические показатели сыворотки крови телят после двукратного внутримышечного введения препарата «Иммуносейв»

№ п/п	Показатель	Ед. Изм.	День эксперимента								
			За 24 часа до эксперимента			Через 7 дней			Через 14 суток		
			1 опытная	2 опытная	Контроль	1 опытная	2 опытная	Контроль	1 опытная	2 опытная	Контроль
1.	Белок общий	г/л	63±4,38	64,4±2,55	63,8±3,09	64,8±2,87	65±3,83	58,3±3,4	73,7±4,11*	74,3±4,76*	61,4±2,43
2.	АЛТ	Е/л	10,3±13,54	10,6±5,65	9,3±2,52	27,4±26,65	10,9±3,74	10±1,61	16,5±7,85	22,9±6,92	17,6±9,1
3.	АСТ	Е/л	93,5±13,51	79,2±14,79	74,6±14,24	96,2±38,36	73,5±23,02	67,2±21,85	88,1±22,39	83,7±17,24	77,7±11,87
4.	Щелочная фосфатаза	Е/л	1008±451,43	1680,9±1898,95	835,4±236,97	1007,5±308,54	856,4±327,86	753,9±225,87	717,2±261,07	766,3±336,52	519,5±200,5
5.	Глюкоза	ммоль/л	3,7±2,3	6,2±4,09	5,2±3,27	2,7±0,33	2,8±0,53	2,8±0,24	4,3±1,55	3±0,36	3,7±0,5
6.	Альбумин	г/л	39,6±2,77	44,2±32,82	46,2±14,48	44,6±7,78	38,6±2,26	50,1±25,58	37±0,72	34,7±2,67	36,4±2,64
7.	Мочевина	ммоль/л	5,3±0,67	5,8±0,99	5,4±0,34	3,6±1,48	4±0,7	4,4±0,57	4,4±1,91	4,7±1,28	3,9±0,72
8.	Креатинин	мкмоль/л	394,1±104,95	270,5±180,22	279,5±141,72	417,7±241,83	690,1±630,11	345,8±332,29	36,8±34,73	36,2±20,69	20,7±13,81
9.	Кальций	ммоль/л	2,7±0,23	3,2±0,7	3,1±0,73	3,8±0,87	4,1±1,53	4,8±0,94	2,3±0,13	2,3±0,13	2,4±0,09
10.	Фосфор	ммоль/л	3,9±0,78	4±0,45	3,6±0,6	4±0,46	3,9±0,7	4,2±0,39	2,5±0,58	1,9±0,65	2±0,54

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при критическом 2,10)

Однако данные показатели как в опытной, так и контрольной группе не выходили за пределы физиологических значений. Что свидетельствует о положительном влиянии препарата на метаболизм белка в организме. Все остальные исследуемые нами биохимические показатели крови соответствуют физиологической норме. Наряду с этим различие в содержании остальных биохимических показателей между опытной и контрольной группой недостоверны и находились в пределах физиологических значений.

Результаты по динамике прироста живой массы телят после однократного внутримышечного введения препарата «Иммуносейв» приведены в таблице 83.

Таблица 83 - Динамика прироста живой массы телят в опытных и контрольной группах

№	№ группы	Масса (кг) после введения через (суток)			Среднесуточный привес за 14 дней, г
		0	7	14	
1.	1	56,7±3,66	56±5,94	59,9±5,51	257,1±118,22*
2.	2	66,4±4,43	65,8±3,97	70,6±5,59	300±162,94*
3.	3 (контрольная)	47,8±2,85	48,2±5,03	49,9±3,3	149,6±80,69

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытной и контрольной группами ($P \leq 0,05$ при критическом 2,10)

Анализируя данные по динамике привеса телят установлено, что интенсивность роста телят, которым вводили исследуемый препарат, достоверно выше, чем у телят в контрольной группе. Вместе с этим наиболее значимые привесы были получены в группе телят, которым вводили препарат в объеме 10 мл на животное, относительно телят контрольной группы.

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что препарат «Иммуносейв» при двукратном внутримышечном введении с интервалом 7 дней телятам в дозах 100 и 200 мг на животное повышает конверсию питательных веществ корма, о чем свидетельствует повышение общего белка в сыворотке крови опытных телят относительно контроля и как следствие увеличение среднесуточных привесов относительно контроля.

3.2.7.4 Комплексная схема лечения поросят при токсической дистрофии печени

Учитывая тот факт, что печень занимает центральное место в процессах углеводного, белкового, липидного обменов, хранения, метаболизма и активации витаминов, экстрамедуллярного гематопоеза, синтезе коагулянтов и антикоагулянтов, белков острой фазы, пищеварении путем синтеза и энтерогепатической циркуляции желчных кислот, а также в процессах детоксикации эндогенных и экзогенных соединений, токсинов и ксенобиотиков посредством их расщепления, окисления и декарбоксилирования. Нарушения возникающие в ней под воздействием агрессивных факторов оказывают негативное влияние на весь организм в целом.

Поэтому лечение животных с патологией гепатобилиарной системы должно быть комплексным и направлено не только на прерывание патогенетических механизмов развития заболевания, но и на восстановление всего организма в целом. Особое внимание в этом вопросе следует обратить на восстановление иммунологической реактивности организма, кроветворной системы, а также восполнение метаболизма витаминов.

В этой связи целью настоящего исследования явилось изучение комплексной схемы лечения токсической дистрофии у поросят с применением инъекционной формы мелилурацила в качестве иммуномодулирующего и адаптогенного средства и витаминной кормовой добавки «Волстар».

Для этого нами было сформировано 2 группы поросят начального периода дорастивания в возрасте 35 – 40 дней, по 14 животных в каждой, с признаками токсической дистрофии печени. Живая масса на начало эксперимента составила 12-14 кг (таблица 84).

Поросятам первой опытной группы назначали силимарин конъюгированный с наночастицами селена (который показал наилучшую терапевтическую эффективность в предыдущих наших опытах) из расчета 0,1 мл/кг массы тела, в/м 1 раз в день 7 дней.

Таблица 84 - Дизайн эксперимента

Лечебная группа	Схема лечения препарат	Способ применения	Объем, кратность, курс	Общее количество животных
1	Исследуемый препарат (Силимарин конъюгированный с наночастицами селена)	в/м	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	12
2	Силимарин конъюгированный с наночастицами селена (Исследуемый препарат)	в/м	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	12
	«Иммуносейв»	в/м	0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней	
	Волстар (витаминная кормовая добавка)	Орально с питьевой водой	0,5 мл, 1 раз в день, 5 дней	

Второй группе наряду с гепатопротекторным препаратом применяли водно-дисперсионный раствор метилурацила «Иммуносейв» в дозе 2 мг/кг (0,1 мл/кг по объему), 1 раз в день 7 дней и витаминную кормовую добавку «Волстар» из расчета 0,5 мл на 10 кг с водой 5 дней.

Методика оценки результатов лечения основывалась на определении следующих показателей: длительность снижения аппетита, снижения общей активности, иктеричности слизистых оболочек, результатах гематологических и биохимических исследований венозной крови.

В течение эксперимента за животными вели наблюдение, учитывали клиническое состояние, активность, потребление корма и воды.

Опытных животных взвешивали перед введением препарата, на 30 сутки после введения препаратов; определяли относительный прирост по отношению к исходной массе тела (%).

В результате проведенных исследований установлено (таблица 85), к 14 суткам эксперимента как гематологические так и биохимические показатели крови достигали референсных значений и не отличались от фоновых.

Таблица 85 – Лабораторные показатели крови поросят отъемного периода

Показатели	Ед. Изм.	Норма	День эксперимента				Фон (n=34)
			За 24 часа до начала эксперимента		Через 14 дней после начала эксперимента		
			1 опытная (n=12)	2 опытная (n=12)	1 опытная (n=12)	2 опытная (n=12)	
WBC	x10 ⁹ /L	11-22	23,8±5,7*	25,4±6,2*	19,4±1,1	18,8±4,16	17,8±4,6
RBC	x10 ¹² /L	5-9,5	6,8±2,56*	6±3,29*	7,1±2,29	8,6±2,04	8,83±1,5
HGB	g/L	99-165	87,5±3,56	69,3±3,11	90±4,04	101,1±3	107±7
HCT	%	32-50	31,7±1,96	25,5±1,36	34±2,22	39,3±2,87	42,4±2,3
АЛТ	Е/л	22-47	54,5±4,82	51,8±4,17	45,9±2,89	40,2±2,8	38,31±3,87
АСТ	Е/л	15-55	63,9±3,02	64,9±5,02	44,9±3,32	40,6±5,02	39,79±4,46
Щелочная фосфатаза	Е/л	до 176	254±16	262,5±14	158,4±13	155,1±13	160±14,9
Мочевина	ммоль/л		3±0,57	3,1±0,39	4±0,18	4,1±0,35	4,2±0,33
Креатинин	ммоль/л		137,1±15,9	136,8±13,8	137,6±13,07	134,5±9,42	136,8±11,48
Билирубин	мкмоль/л	0,3-8,2	12,8±1,17	13,2±1,25	6,4±0,35	5,9±0,25	5,43±0,47
Белок общий	г/л	60-83	65,7±7,67	62,1±3,82	65,9±5,63	63,9±5,46	62,1±6,25
Альбумин	г/л	23-40	24,9±3,12	23,9±2,18	25,9±1,3	24±0,91	24,4±1,52
Глобулин	г/л	39-60	40,8±8,86	38,1±4,72	40±4,97	39,9±4,94	37,7±7,6
МДА	нмоль/л		16,7±1,92*	17,99±1,96*	4,11±0,46	3,56±0,69	3,24±0,29
ГПО	мкмоль G-SH /л x мин		19,8±1,86*	18,54±1,82*	23,18±1,98*	22,53±2,09	18,22±1,97

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между опытными и контрольной (фоновой) группами (P ≤ 0,05 при критическом 2,10)

Вместе с этим через 30 дней после начала эксперимента провели повторное контрольное взвешивание животных (таблица 86), которое показало, что среднесуточный прирост массы тела поросят, которым с лечебной целью наряду с гепатопротекторным средством назначали инъекционный Метилурацил и витаминную кормовую добавку на 30% выше, чем в группе животных которым применяли только гепатопротекторное средство.

Таблица 86 -Динамика прироста живой массы поросят в опытных группах

№ группы	Масса в кг после введения через (суток), кг		Прирост за 30 дней, кг	Среднесуточный прирост за 30 дней, г
	0	30		
1	13,6±0,56	18,7±1,12*	5,1±0,23*	170±23,56*
2	12,8±0,64	20,3±1,08	7,5±0,30	250±26,98

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между первой и второй группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

Таким образом, можно заключить, что применение мицеллярного раствора метилурацила и витаминной кормовой добавки «Волстар» наряду с гепатопротекторным препаратом «СилимаринКС) приводит не только к восстановлению функциональной активности печени у поросят при токсической гепатодистрофии. А также стимулирует прирост живой массы поросят.

3.2.7.5 Комплекс профилактических мероприятий патологий гепатобилиарной системы у животных с применением разработанных препаратов, а также препаратов, стимулирующих процесс регенерации и витаминных кормовых добавок

Целью данного исследования явилось изучение эффективности применения разработанной нами схемы профилактики патологий печени у поросят, включающей препарат силимарина конъюгированный с наночастицами селена, мицеллярный раствор метилурацила и витаминную кормовую добавку «Волстар».

Предметом исследования были поросята отъемного периода, которых идентифицировали и оценивали в отношении переменной исследования на индивидуальной основе.

Объектом исследования служили разработанные нами препараты:

- силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС);
- мицеллярный раствор метилурацила (иммуносейв);
- водорастворимый витаминный комплекс (Волстар).

Все животные подвергались комплексному обследованию, которое включало в себя клиническое и лабораторное исследование.

Исходя из полученных в ходе выше указанных исследований, проводили формирование групп по принципу аналогов (таблица 87).

После включения в исследование поросят взвесили и сформировали по принципу аналогов 2 группы, контрольную и опытную. Последовательно основанных на массе тела и возрасте.

Животные всех групп содержались в одинаковых условиях и получали сбалансированный по белку и всем биологически-активным веществам комбикорм. Анализ кормов на микотоксины (Т-2 токсин, афлатоксин), выявил, что их концентрация соответствовала ПДК. Кислотное число комбикормов также соответствовало показателям безопасности кормов, но часто находилось на верхней границе предельно-допустимых концентраций. Несмотря на то, что содержание микотоксинов находилось в пределах нормы, следует учесть, что при длительном их поступлении возможна кумуляция (накопление в организме), что сопровождается развитием в печени дистрофических изменений на почве хронической интоксикации.

Животным первой опытной группы в качестве гепатопротекторного препарата назначали силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС), внутримышечно в дозе 100 мг/кг, двукратно с интервалом 7 дней.

В качестве иммуномодулирующего и адаптогенного средства мицелярный раствор метилурацила «Иммуносейв» в дозе 100 мг/кг, внутримышечно, двукратно с интервалом 7 дней.

Водорастворимую витаминную кормовую добавку «Волстар» внутрь с питьевой водой, в объеме 0,5 мл на голову, 1 раз в день, 3 дня.

Животные второй контрольной группы были интактными, фармакологические препараты не применялись.

Методика оценки результатов основывалась на определении следующих показателей: заболеваемость, летальность и среднесуточный прирост живой массы.

Таблица 87 - Дизайн эксперимента

Лечебная группа	Схема лечения препарат	Способ применения	Объем, кратность, курс	Общее количество животных
1	Силимарин конъюгированный с наночастицами селена (Исследуемый препарат)	в/м	0,1 мл/кг, 1 раз в 7 дней, двукратно	30
	«Иммуносейв»	в/м	0,1 мл/кг, 1 раз в 7 дней, двукратно	
	«Волстар» (витаминная кормовая добавка)	Орально с питьевой водой	0,5 мл, 1 раз в день, 3 дня	
2	Контрольная			30

В результате проведённых исследований установлена положительное влияние применения разработанной нами комплексной схемы, включающей Силимарин конъюгированный с наночастицами селена, водорастворимый мицелярный метилурацил (Иммуносейв) и витаминный комплекс «Волстар» на прирост массы поросят отъемного периода. Так в опытной группе поросят среднесуточный прирост живой массы (таблица 88) составил $331 \pm 23,56$ г что на 28 % больше, чем в контрольной группе $303 \pm 26,98$ г.

Таблица 88 -Динамика прироста живой массы поросят в опытных группах (n=55)

№ группы	Масса в кг после введения через (суток), кг		Прирост за 30 дней, кг	Среднесуточный прирост за 30 дней, г
	0	30		
1 опыт	$12,87 \pm 0,74$	$22,8 \pm 2,23$	$9,9 \pm 0,89$	$331 \pm 23,56$
2 контроль	$13,1 \pm 0,68$	$22,2 \pm 2,38$	$9,1 \pm 0,93$	$303 \pm 26,98^*$

Примечание: * Различие по данному показателю статистически достоверно между первой и второй группами ($P \leq 0,05$ при t критическом 2,10)

Вместе с этим применение комплексной схемы, включающей Силимарин конъюгированный с наночастицами селена, водорастворимый мицелярный метилурацил (Иммуносейв) и витаминный комплекс «Волстар» поросятам

отъемного привело к снижению заболеваемости на 16,6 %, и повышению сохранности на 3,3 % (рисунок 45).

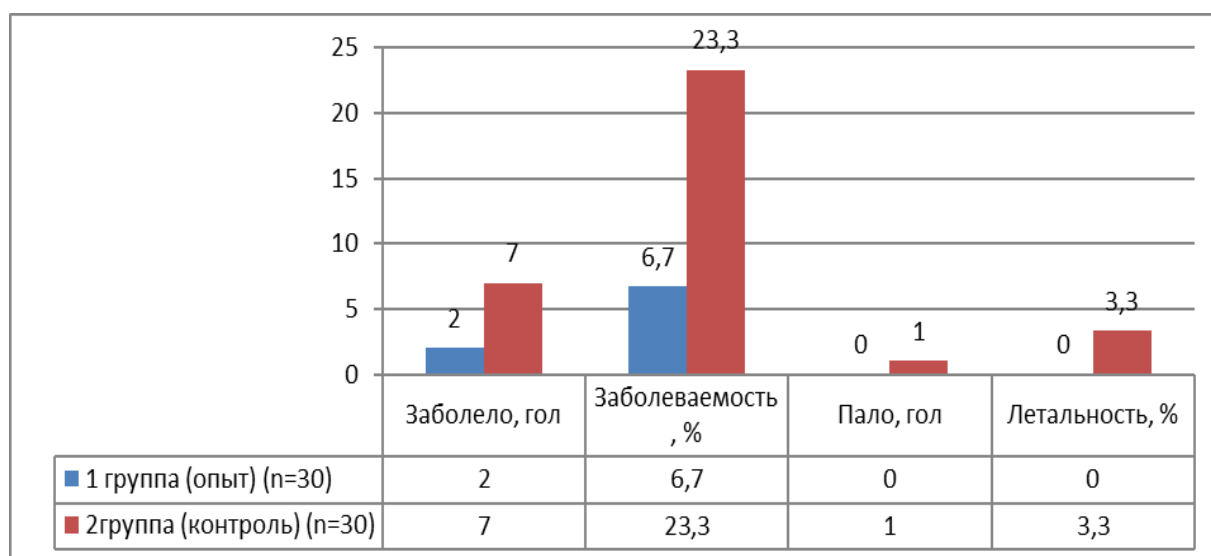


Рисунок 45 - Эффективность применения поросётам-отъёмшам комплексной схемы профилактики патологий печени

Таким образом на основании проведенных исследований можно заключить, что применение поросётам отъемного периода комплексной схемы профилактики заболеваний печени, включающей инъекционный препарат силимарина конъюгированный с наночастицами селена, мицеллярный раствор метилурацила и витаминную кормовую добавку «Волстар» приводит к повышению среднесуточных привесов на 28 % и снижению заболеваемости на 16,6 %.

3.2.8 Экономическая эффективность применения комплексной схемы, включающей препарат силимарина конъюгированный с наночастицами селена, мицеллярный раствор метилурацила и витаминную кормовую добавку «Волстар» в свиноводстве

Расчет экономической эффективности применения комплексной схемы, включающей препарат силимарина конъюгированный с наночастицами селена, мицеллярный раствор метилурацила и витаминную кормовую добавку «Волстар» поросётам отъемного периода (35-40 дней) проведен по следующему алгоритму:

Провели расчет фактического ущерба (Уф), причинённого заболеванием:

Среднесуточный прирост массы тела клинически здоровых поросят составил $303 \pm 26,98$ г, животных опытной группы - $331 \pm 23,56$ г.

$$Уф = (Пз - Пб) * Мб * Д * Ц,$$

Где:

Пз и Пб – среднесуточная продуктивность опытных и контрольных животных соответственно (кг);

Мб – количество животных (голов);

Д – продолжительность наблюдения (дни);

Ц – закупочная цена 1 кг продукции (руб.).

$$Уф = (0,331 - 0,303) * 30 * 30 * 200 = 5040 \text{ руб.}$$

Провели расчет затрат на проведение ветеринарных мероприятий (Зв):

Себестоимость препарата «Силимарин КС» во флаконе на 1 инъекцию 10 руб., (Проведено 60 инъекций на сумму 600 руб), препарат «Иммуносейв» -10 руб., (Проведено 60 инъекций на сумму 600 руб), витаминная кормовая добавка «Волстар» - 1158 руб за 1 л. (с профилактической целью поросятам на курс израсходовано 45 мл на сумму 52,11 руб.). Для инъекции использовали одноразовые шприцы дозаторы. Итого на проведение курса профилактических мероприятий затрачено 1252,11 руб.

Оплата введения препарата ветеринарным специалистом составила 150 руб.

$$Зв = 1252,11 + 200 = 1452,11 \text{ руб.}$$

Экономический эффект, полученный в результате осуществления профилактических мероприятий (Эв), определяли по формуле:

$$Эв = Эз - Эв, (11)$$

где:

Эз - экономия трудовых и материальных затрат в результате применения более эффективных средств и методов проведения ветеринарных мероприятий, р.;

Зв - затраты на ветеринарные мероприятия, руб.

$$\text{Эв} = 5040 - 1452,11 = 3587,89 \text{ руб.}$$

Экономический эффект от проведения профилактических мероприятий на рубль затрат (Эр) определяли по формуле:

$$\text{Эр} = \text{Эв}/\text{Зв.}$$

Где:

Эр – эффективность ветеринарных мероприятий на рубль затрат, руб.;

Эв – величина экономического эффекта, руб.;

Зв - сумма ветеринарных затрат, руб.

$$\text{Эр} = 3587,89 : 1452,11 = 2,47 \text{ руб.}$$

Экономический эффект составил 3587,89 руб., а эффективность ветеринарных мероприятий из расчета на 1 рубль затрат – 2,47 руб.

Таким образом, в условиях производства подтвердилась высокая эффективность применения комплексной схемы, включающей препарат силимарина конъюгированный с наночастицами селена, мицеллярный раствор метилурацила и витаминную кормовую добавку «Волстар» пороссятам.

В результате проведенных расчетов можно сделать вывод, что мероприятия по профилактике токсической дистрофии поросят на начальном этапе доразщивания являются экономически выгодными для применения на свиноводческих комплексах. На каждый затраченный рубль на оказание профилактических мероприятий хозяйство получает 2,47 рубля прибыли.

IV. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как показывает статистика, патологии печени занимают от 5 до 25% от всех незаразных болезней животных (И.Ф. Хазимухаметова, 2009, Б.В. Уша и др., 2011, Н.А. Фердман, 2007, С.Н. Жерлицын, 2016, Н.Б. Демина, 2007, В.И. Десятник и др. 2000, В.В. Емельянов, И.З. Севрюк, 2005, А.В. Жаров, В.Д. Илеиш, 1996).

При всем многообразии этиопатогенетических механизмов развития патологических процессов в печени, основные звенья патогенеза по большей части универсальны. Это позволяет использовать достаточно близкую патогенетическую терапию поражений гепатобилиарной системы. Основу, которой могут составлять лекарственные средства с направленным действием на печеночные клетки (И.Н. Алексеева, Т.М. Брызгина, С.И. Павлович, 1991, М.З. Андрейцев, 2006, В.Н. Байматов, 1982, В.Н. Байматов, С.М. Муха, 1981, R.O. Rechnagel, 1983, L.W. Weber [et al.], 2003)

К таким препаратам в нашей стране относят группу лекарственных средств под общим названием «Гепатопротекторы». Хотя нельзя не отметить, что данный термин практически не используется за рубежом (K. Wellington [et al.], 2001). Это объясняется тем что термин «Гепатопротектор» в классическом переводе обозначает, что лекарственное средство должно повышать устойчивость печени к патологическим воздействиям. Тогда как в нашей стране гепатопротекторные средства - это отдельная фармакотерапевтическая группа разнородных по механизмам действия лекарственных средств, которые как препятствуют разрушению клеточных мембран гепатоцитов, так и стимулируют их регенерацию, а также усиливают ее обезвреживающую функцию, стимулируя активность ее ферментных систем и способствуют восстановлению ее функций при различных повреждениях (Н.П. Баранов, 1984, Л.Ф. Виноградова, Ж.А. Мирзоян, Е.В. Харлицкая, Н.С. Манякина, 2000, М. А. Джавахян, Ю.С. Канунникова, 2012, Ю.А. Кинзирская [и др.], 2003, А.Г. Савойский, А.Н.

Кушнирская, В.Н. Байматов, 1982, Е.В. Рябова [и др.], 2012, М.Н. Сомова [и др.], 2013)

К наиболее перспективным препаратам, отвечающим требованиям современной гепатологии можно отнести флавоноиды, выделяемые из лекарственного растения расторопши пятнистой, поскольку они обладают гепатопротекторным, противовоспалительным, иммуномодулирующим и антиканцерогенным действием. (Р.П. Рустамова [и др.], 2004, S. Pollastri [et al.], 2011, С. Dehmlow, J. Erhard, H. de Groot, 1996, V. Kren, D. Walterova, 2005).

В этой связи на первом этапе нашей работы сконструированы новые водорастворимые лекарственные гепатопротекторные препараты силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц (мицелл):

Воднодисперсный гепатопротекторный препарат, представляющий собой комплекс изомерных биофлавоноидных соединений - флаволигнанов, выделяемые из лекарственного растения расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.). В качестве активнодействующего вещества исследуемый препарат содержит силимарин – 12 мг, дополнительного активнодействующего вещества витамин Е – 2 мг, в качестве органического растворителя 1-метил-2-пирролидон – 0,22 мл, солюбилизатора кремофор – 0,08 мл, консерванта - бензиловый спирт – 0,01 мл, и сорастворитель - воду для инъекции – до 1 мл.

Препарат «Коллоидный селен и силимарин», содержащий в качестве активнодействующих веществ силимарин (концентрация 5,76 мг/мл) и наночастицы селена (0,24 мг/мл).

Препарат «Коллоидное золото и силимарин» содержащий в качестве активнодействующего вещества силимарин (концентрация 0,08 мг/мл) и наночастицы золота (164,163 мкг/мл).

В ходе изучения их общетоксических свойств установлено, что средне смертельная доза для мицелярного раствора силимарина составила 16879 ± 5956 мг/кг. Для препаратов на основе коллоидных частиц селена и золота средне смертельную дозу установить не удалось, так как максимально возможные дозы для внутрижелудочного введения не привели к гибели ни одного животного.

Согласно общепринятой гигиенической классификации ГОСТ 12.1.007-76, все препараты относятся к 4 классу опасности (вещества малоопасные). При этом после курсового парентерального введения животным препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц один раз в день, в течение 14 дней значимых отличий в физиологических и биохимических показателях у животных подопытной группы и интактных животных не наблюдалось. Клинический анализ периферической крови показал, что внутримышечное введение препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц один раз в день, на протяжении 14 дней не приводит к достоверному изменению гематологических показателей крови. Данные показатели не отличаются от значений контрольной группы животных на всем протяжении опыта. При исследовании влияния препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц на основные показатели метаболизма в хроническом эксперименте отличий между опытной и контрольной группами не выявлено. При длительном парентеральном введении препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц один раз в день, в течение 14 дней, отклонений физиологических значений основных показателей мочи не выявлено. Показатели, характеризующие состояние центральной нервной системы и работоспособности животных опытной группы, достоверно не отличаются от показателей выявленных у контрольной группы животных. Курсовое парентеральное введение животным препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц 1 раз в день в течение 14 дней не привели к статистически значимому изменению динамики прироста массы тела у опытных животных по сравнению с контрольными. Кроме того, массовые коэффициенты органов и динамика прироста живой массы у животных опытных групп находятся на одном уровне с контролем и достоверно от него не отличаются. Согласно межгосударственному стандарту ГОСТ ISO 10993-10—2011 лекарственные препараты на основе коллоидных частиц и полимерных матриц обладают слабой степенью ответной реакции на раздражение у кроликов. Кроме того, препараты

водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ), силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС), силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) не обладают аллергизирующими свойствами. Наряду с этим, установлено, что курсовое введение в терапевтических дозах препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц («СилимаринМ», «СилимаринКС», «СилимаринКЗ») не оказывает иммунотоксического действия на организм животных.

Однако, следует отметить, что при внутривенном введении препарата силимарина на основе полимерных матриц вызывает аллергическую реакцию немедленного типа. Сопровождающуюся кратковременным возбуждением (беспокойство) животного в течении 1-2 минут, которое сменяется угнетением, переходящим в ступор. Со стороны сердечно-сосудистой системы отмечается тахикардия (до ритма галопа), цианоз слизистых, реже – отёки в области нижнечелюстного пространства и подгрудка. Со стороны дыхательной системы – тахипное (поверхностное учащённое дыхание). Реже – непроизвольный акт мочеиспускания и дефекации. Что необходимо учитывать при назначении данного препарата. О данных аллергических реакциях при введении препаратов на основе полимерных матриц указано в работах (H. Jiunn Lin, H.Y. Lu, 1997, S. Okazaki [et al.], 2003, I.B. Pathan, C.M. Setty, 2009).

При изучении специфической гепатопротекторной активности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц в экспериментах на культуре изолированных гепатоцитов (*in vitro*) печени крыс, установлено, что внесение лекарственных препаратов на основе коллоидных частиц и полимерных матриц препятствует гепатотоксическому действию CCl₄. В образцах с отрицательным контролем отмечается снижение дыхательной активности клеток на 25% по сравнению с контролем. Кроме того, в образцах, содержащих только препарат коллоидный селен и силимарин без токсина, отмечается достоверное увеличение дыхательной активности гепатоцитов на 29% по сравнению с контролем. В результате определения активности ферментов в среде инкубации

установлено повышение активности ферментов цитолиза в клеточной суспензии с внесением гепатотоксина в 3 раза относительно фоновых значений. Вместе с этим наблюдается повышение активности и в среде инкубации где наряду с гепатотоксином вносили испытуемые препараты в среднем на 70 %, что достоверно ниже чем в отрицательном контроле. Тогда как внесение в инкубационную среду лекарственных препаратов не оказывало влияния на активность данных ферментов в инкубационной среде, где данный показатель не отличался от контрольных значений. Данный факт указывает, что препараты обладают гепатозащитным эффектом, препятствуют разрушению гепатоцитов при поражении клеток токсическими веществами (CCl₄). О специфической гепатопротекторной активности препаратов силимарина на клеточные культуры гепатоцитов указано в работах И.И. Краснюк (мл.) [и др.], 2005, М.В. Осиков, 2007, И.В. Мильто, И.В. Суходоло, А.А. Миллер, 2012, В.И. Ноздрин, Т.А. Белоусова, В.И. Альбанова, О.И. Лаврик, 2006, В.И. Ноздрин [и др.], 2008, В.И. Ноздрин, Т.А. Белоусова, А.Н. Яцковский, 2000, Л.И. Самигуллина, Д.Н. Лазарева, 2004, В.И. Смольякова [и др.], 2011)

Однако, учитывая тот факт, что гепатопротективное действие *in vivo* и *in vitro* могут не коррелировать. Следующим этапом наших исследований было изучение гепатопротекторных свойств препаратов при индуцированном тетрахлорметаном экспериментальном гепатите у мышей.

В ходе изучения гепатопротекторных свойств на модели острого токсического гепатита смертность лабораторных животных за 7 дней эксперимента, составила в первой группе 50%, во второй, - 10 %, в четвертой опытной группе – 20 %, в третьей группе животных гибели не отмечалось и в пятой (интактной) признаков интоксикации и гибели животных не выявлено.

Через 7 суток после начала эксперимента все животные подвергались эвтаназии путем транслокации шейных позвонков под эфирным наркозом. Предварительно животных взвешивали. После эвтаназии у мышей брали кровь, затем подвергали вскрытию. У всех животных извлекали печень, которую взвешивали. Определяли коэффициент массы печени.

При анализе гематологических показателей (А.А.Кишкун, 2007, Н.П. Ролдугина, В.Е. Никитченко, В.В. Яглов, 2004, Г.В. Сухарева [и др.], 2004) установлено достоверное снижение общего количества лейкоцитов у животных первой группы, которым вводили токсикант без проведения терапевтических мероприятий, по сравнению с контрольными мышами. Данный факт указывает на посттравматическое истощение иммунной системы. Вместе с этим количество лейкоцитов у животных 2 и 4 группы, которым в течение 6 дней вводили мицелярный силимарин и силимарин конъюгированный с коллоидным золотом соответственно, было несколько выше чем в 5 (фоновой) группе животных. Тогда как в третьей опытной группе мышей которым вводили силимарин конъюгированный с коллоидным селеном, показатели не отличаются от фоновых мышей. Что является следствием антиоксидантного влияния селена, который препятствует накоплению продуктов перекисного окисления липидов, способствуя восстановлению глутатиона, а также апоптозу клеточных элементов печени, которые утилизируются лейкоцитами.

Анализ биохимических показателей сыворотки крови животных (А.А.Кишкун, 2007, Б.А.Никулин, 2007, Т.Е. Ткаченко, 2003, А.Я Цыганенко, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, И.В. Завгородний, 2002) после окончания эксперимента показал достоверное снижение индикаторных ферментов печени во всех группах животных. Данный факт указывает на восстановление структурно-функциональных свойств гепатоцитов, снижение воспалительно-деструктивных процессов в печени. Однако в четвертой группе мышей, которым проводили лечение препаратом силимарина конъюгированного с коллоидным золотом, активность данных ферментов была достоверно выше чем в контрольной группе. Вместе с этим в данной группе животных отмечаются более высокие показатели глюкозы, и альбуминов, а также относительно низкие показатели общего белка и глобулинов в сыворотке крови. Принимая во внимание тот факт, что трансаминазы обеспечивают взаимосвязь между обменом азотистых соединений и углеводов в организме животных, повышение индикаторных ферментов на фоне высоких концентраций альбуминов и углеводов свидетельствуют о повышении

энергетического метаболизма в организме животных. А понижение глобулинов может быть следствием увеличения моноцитарно-макрофагальной функции печени. Это является следствием применения препарата силимарина конъюгированного с коллоидным золотом. О данном эффекте золотых наночастиц упоминается в работах Ю.А. Терещенко, С.Ю. Терещенко, 2013, M.S. Khan, G.D. Vishakante, H. Siddaramaiah, 2013, Warheads Shanta Dhar [et al.], 2009.

В третьей опытной группе животных, которым применяли с терапевтической целью силимарин конъюгированный с коллоидным селеном, отмечали достоверное повышение общего белка и его фракций, относительно фоновых животных, что может быть следствием синергизма силимарина и селена, способствующих повышению компенсаторных факторов организма на действие ксенобиотика.

Вместе с этим у животных первой опытной группы отмечаются достоверно более низкие показатели альбуминов, при завышенных концентрациях глобулиновых фракций белка относительно контрольных животных. Данные изменения указывают на снижение альбуминсинтезирующей функции печени в организме животных на фоне применения ксенобиотика, а повышение глобулиновых фракций является следствием выброса в кровь белков острой фазы воспаления, что и указывает на наличие воспалительно-деструктивных процессов в паренхиме печени.

Снижение общего белка и альбуминов отмечается и во второй опытной группе мышей, которым с терапевтической целью назначали мицелярный силимарин. Это может быть следствием повышенных затрат энергии на восстановление функциональной активности гепатоцитов поврежденных действием ксенобиотика.

При оценке массы печени животных через 7 суток после начала эксперимента отмечается положительная динамика изменений коэффициента массы печени во всех опытных группах животных. На сельскохозяйственных животных (свиньи) подобные эксперименты проводились Л.А. Макаридзе, З.А. Макаридзе, 2006, С.Ю. Смоленцев, 2007)

При анализе концентрации глутатиона в печени опытных животных через 7 суток после начала эксперимента концентрация его резко снижается у животных, которым лечение не применялось. Оценка способности рециркуляции глутатиона под воздействием препаратов явилось важным аспектом для определения эффективности разработанных препаратов. Значение антиоксидантной системы в развитии гепатопатологий отмечалось в работах Т.Г. Сазонтова, Ю.В. Архипенко, 2007, С.В. Сибиряк, В.А. Вахитов, Г.Ш. Курчатова, 2003, И. В. Сидоров., Н.А. Костромитинов, Е.М. Уколова, 2003, В. С. Слободяник, 2007, Д.М. Собчак, О.В. Корочкина, 2008, В.Н. Чернов [и др.], 2007). Данный факт указывает на закономерное истощение глутатиона в ответ на окислительный стресс, вызванный введением гепатотоксина. Вместе с этим, в группах мышей которым применяли препараты силимарина концентрация глутатиона была достоверно выше, чем в первой группе и находилась на одном уровне с интактными животными. Это объясняется тем, что силибинин входящий в состав препаратов обладает ярко выраженными антиоксидантными свойствами, что препятствует истощению глутатиона в гепатоцитах в ответ на воздействие ксенобиотика. Положительное воздействие некоторых биологических веществ и используемый в настоящей работе методики также указываются в работах Н.П. Пальмина [и др.], 2004, Т.Е. Полунина, 2005, В.В. Рогожин, 2009.

При изучении терапевтической эффективности препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц при гепатозе у коров в условиях животноводческого хозяйства достоверно установлено, что парентеральное применение с терапевтической целью больным гепатозом коровам препаратов силимарина на основе коллоидных частиц и полимерных матриц приводит к восстановлению функциональной активности печени. Постановка эксперимента в условиях животноводческого хозяйства была поставлена, основываясь на разработках В.В. Емельянов, И.З. Севрюк, 2005, Г.Е. Батрак, А.Н. Кудрин, 1979)

Вместе с этим, препарат силимарина на основе коллоидного селена наряду ярко выраженными гепатопротекторными свойствами, проявил выраженное

антиоксидантное действие, в результате чего активнее осуществляются регенеративные процессы и связывание токсических веществ.

Также в ходе применения препаратов силимарина на основе наночастиц (селена и золота) и полимерных матриц при лечении собак с вторичным инвазионным гепатитом и поросят с токсическим поражением печени, доказана их высокая терапевтическая эффективность. Различные схемы лечения, методы введения препаратов, активность лекарственных веществ на животных указывается в работах С. С. Абрамов [и др.], 2007, 3. Пейсак, 2008, С.В. Петровский, Н.К. Хлебус, В. Н Целобёнок, 2011, Т.В.Плетнева, 2005, А.А.Покровский, 1969, В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.И. Ковалева, 1990, С.В. Котельникова, Н.Г. Соколова, А.В. Котельников, 2008)

Учитывая тот факт, что при патологии гепатобилиарной системы происходят глубокие нарушения всех видов обменных процессов в организме животных и как следствие снижение иммунитета, нарушение кроветворной системы (о чем говорилось выше), а все это даже после назначения гепатопротекторных средств и восстановления функциональной активности органа ведет к достаточно длительному реабилитационному периоду, и как следствие длительному восстановлению продуктивных качеств животных (И. П. Кондрахин, 2004, Н.В. Мухина, 2008, Т.Т. Накусов [и др.], 2005, О. В. Погребняк, В. С. Слободяник, С. М. Сулейманов, 2001

Поэтому на следующем этапе нашей работы нами проведена апробация новой мицеллярной инъекционной формы на основе метилурацила в разработке которого мы принимали непосредственное участие. А также витаминной кормовой добавки «Волстар» в схеме лечения токсической дистрофии печени у поросят (в разработке которого мы также принимали участие).

В данном случае нас заинтересовал тот факт, что метилурацил приводит к выраженной синхронизации всех процессов, организующих пролиферацию клеток печени при этом не как инициатор, а как ускоритель клеточного деления только в поврежденном органе. Принципиальным является тот факт, что метилурацил не проявляет свое поливалентное воздействие, в том числе

анаболическое, на здоровый орган (В.И. Альбанова, К.С. Гузев, К.В. Ноздрин, 2007, С.Ж. Байгурина, Б.С. Кушербаев, Р.А. Майжанова, З.О. Сембиева, 1991, Г.Л.Билич, В.Н.Отмахов, 1979, О.И.Волощенко, 1976, Ю.С. Макляков [и др], 2006, А. П. Калашников, 2003)

В этой связи нами разработана новая водорастворимая лекарственная форма метилурацила.

Наряду с этим, существенным является тот факт, что печень является депо жирорастворимых витаминов. В этой связи у животных с различными заболеваниями печени широко распространены микроэлементозы и гиповитаминозы, что усугубляет течение основного заболевания. Комплексная терапия патологий печени должна включать в себя и коррекцию недостатка витаминов, а также микро - и макроэлементов, что способствует нормализации обмена веществ, улучшению регенерации ткани в печени и повышение общей резистентности организма (М.Д Машковский, 2010, М.В. Воромин [и др.], 2004, В. И. Дудин, 2004, X-Y. Bai [et al.], 2003, D.Bikle, S.L. Booth [et al.], 2004, K.Brock [et al.], 2004, С.М. Bula [et al.], 2005, M.L. Colombo, 2010, P. Mascio Di, M.E. Murphy, H. Sies, 1991, A.M. Drotleff, W. Ternes, 2001)

Поэтому нами была разработана стабильная водорастворимая сбалансированная комбинация основных витаминов и селена, содержащая: витамины А, D₃, Е, С и вспомогательные компоненты (полисорбат-80, 2-пирролидон, спирт бензиловый и дистиллированную воду). Разработанный препарат представляет сбалансированную комбинацию основных витаминов и селена. В 1 мл препарата содержится: витамина А – 50000 МЕ; витамина D₃ – 200 МЕ, Е – 30 мг, С – 100 мг. Препарат представляет собой прозрачную, опалесцирующую жидкость от светло-желтого до желтого цвет, хорошо смешивающуюся с водой.

При изучении переносимости и безопасности орального применения витаминной кормовой добавки поросётам показало, что применение прпарата «Волстар» в дозировке 0,5-1 мл на 10 кг живой массы способствует нормализации

обмена веществ у поросят, а также повышению жизнеспособности молодняка и увеличению продуктивности.

В ходе изучения влияния инъекционной формы на основе метилурацила установлено, что данный препарат при однократном внутримышечном введении поросятам отъемышам в дозах 4 и 6 мг/кг живой массы стимулирует гемопоэтическую функцию организма, повышает конверсию питательных веществ корма, о чем свидетельствует повышение общего белка за счет фракции альбуминов в сыворотке крови опытных поросят относительно контроля и как следствие приводит к увеличению среднесуточных привесов относительно контроля. К сходным результатам пришли в своих исследованиях Н.Б. Ларькина, Е.Б. Романенко, А.В. Лебедев, 1995, С. С. Абрамов [и др.], 2007, М.А. Самотруева [и др.], 2015, .

Учитывая тот факт, что печень занимает центральное место в процессах углеводного, белкового, липидного обменов, хранения, метаболизма и активации витаминов, экстрамедуллярного гематопоэза, синтезе коагулянтов и антикоагулянтов, белков острой фазы, пищеварении путем синтеза и энтерогепатической циркуляции желчных кислот, а также в процессах детоксикации эндогенных и экзогенных соединений, токсинов и ксенобиотиков посредством их расщепления, окисления и декарбоксилирования. Нарушения возникающие в ней под воздействием агрессивных факторов оказывают негативное влияние на весь организм в целом (М. М. Джанашия [и др.], 2001, В.Г.Зайцев, 2001, С.Ю. Зайцев, Ю.В. Конопатов, 2004, Е.А. Корочкина, 2012, Е.А. Корочкина, 2014, В.З. Ланкин [и др.], 2007, П. Ф.Литвицкий, 2006)

Поэтому лечение животных с патологией печени должно быть комплексным и направлено не только на прерывание патогенетических механизмов развития заболевания, но и на восстановление всего организма в целом. Особое внимание в этом вопросе следует обратить на восстановление иммунологической реактивности организма, кроветворной системы, а также восполнение метаболизма витаминов (Ю.Р. Шифф, М.Ф. Соррел, У.С. Мэддрей,

2011, И.А. Шперлинг [и др.], 2008, Б.И. Шулутко, 1995, Б.Г. Юшков, И.Г. Данилова, Ю.С. Храмцова, 2006).

В этой связи нами разработана и проведено испытание комплексной схемы лечения токсической дистрофии у поросят с применением в качестве гепатопротекторного средства силимарин конъюгированный с наночастицами селена, а также инъекционной формы метилурацила в качестве иммуномодулирующего и адаптогенного средства и витаминной кормовой добавки «Волстар». В ходе, которого установлено, что применение мицеллярного раствора метилурацила и витаминной кормовой добавки «Волстар» наряду с гепатопротекторным препаратом «СилимаринКС» приводит не только к восстановлению функциональной активности печени у поросят при токсической гепатодистрофии. А также стимулирует прирост живой массы поросят по сравнению с животными которым применяли только гепатопротектор.

Нами также разработан комплекс профилактических мероприятий патологий гепатобилиарной системы у животных с применением разработанных препаратов, а также препаратов, стимулирующих процесс регенерации и витаминных кормовых добавок.

В результате изучения эффективности применения разработанной нами схемы профилактики патологий печени, выявлено, что применение поросятам отъемного периода комплексной схемы, включающей инъекционный препарат силимарина конъюгированный с наночастицами селена, мицеллярный раствор метилурацила и витаминную кормовую добавку «Волстар» приводит к повышению среднесуточных привесов на 28 % и снижению заболеваемости на 16,6 %.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработаны новые лекарственные формы силимарина конъюгированного с нано частицами селена и золота. Препараты содержат в качестве активноедействующего вещества экстракт плодов расторопши пятнистой в концентрации 5,76 мг/мл и 0,08 мг/мл соответственно, а также наночастицы селена (0,24 мг/мл) и золота (0,164 мг/мл). Препарат силимарина в мицеллярной форме содержит в своем составе экстракт плодов расторопши пятнистой (силимарин 12 мг/мл), витамин Е (2 мг/мл), растворитель и соразтворитель на водной основе.

2. Разработанные новые лекарственные формы силимарина (экстракт плодов расторопши пятнистой) на основе наночастиц селена и золота, а также полимерных матриц (мицелл) представляют собой эффективные гепатопротекторные препараты, обладающие детоксикационным, регенерирующим и антифиброзирующим действием.

3. По результатам определения острой и хронической токсичности, новые лекарственные формы силимарина относятся к IV классу опасности – малоопасные вещества (ГОСТ 12.1.007-76), относятся к умеренно кумулятивным соединениям (3 класс опасности), не обладают аллергизирующим, местно-раздражающим, эмбриотоксическим, сенсibiliзирующим и иммунотоксическим действием.

4. При проведении сравнительной оценки гепатопротекторной активности новых лекарственных форм силимарина в экспериментах на изолированных гепатоцитах (*in vitro*) было установлено, что новые лекарственные формы силимарина обладают цитопротективным эффектом, препятствуют цитолитическому действию ксенобиотика.

5. При проведении сравнительной оценки гепатопротекторной активности новых лекарственных форм силимарина в эксперименте по моделированию токсического гепатита на лабораторных животных, установлено, что максимальный гепатопротекторный эффект отмечен при использовании

лекарственной формы силимарина конъюгированного с нано частицами селена в дозе 100 мг/кг массы тела в течение 7 дней. Менее выражен гепатопротекторный эффект при применении лекарственной формы силимарина конъюгированного с нано частицами золота в дозе 100 мг/кг массы тела в течение 7 дней. Наименее значимые результаты гепатопротекторного действия получены на фоне применения мицеллярной формы силимарина, менее выражено влияющего на процессы регенерации гепатоцитов, вызванные развитием токсического гепатита.

6. При изучении морфологических изменений, возникающих в ткани печени под воздействием разработанных лекарственных препаратов установлено, что наиболее отчётливое гепатопротекторное действие наблюдалось при использовании лекарственной формы силимарина конъюгированного с нано частицами селена, оказывающей четко выраженный эффект снижения структурных нарушений печени и сопровождались незначительным количественным превышением содержания эритроцитов в крупных и мелких кровеносных сосудах, при этом структура ткани печени была хорошо выражена, балочная структура и тинкториальные свойства сохранены.

7. При лечении острого гепатита у собак лекарственная форма силимарина конъюгированного с нано частицами селена показала 100% терапевтическую эффективность. Данный препарат назначался курсом в течении 7 дней, при этом видимое улучшение клинического состояния у 60% животных наблюдалось уже через 3 дня. К 7 дню лечения была отмечена плавная нормализация гематологических показателей крови, значительное снижение показателей АСТ и АЛТ, восстановление значений γ -ГТФ, снижение количества общего билирубина. Меньшую терапевтическую эффективность показали лекарственная форма силимарина конъюгированного с нано частицами золота и мицеллярная форма силимарина соответственно.

8. При лечении гепатоза у коров применение лекарственной формы силимарина конъюгированного с наночастицами селена приводит к снижению концентрации белка острой фазы ферритина с $2,74 \pm 0,28$ до $1,63 \pm 0,09$ мкг/л, снижает концентрацию продуктов перекисного окисления липидов МДА с

1,91±0,14 нмоль/л до 0,67±0,06 нмоль/л, повышает активность антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы 10,58±0,74 до 14,87±1,01 мкмоль G-SH /л x мин, а так же приводит к нормализации пигментного обмена (снижает концентрацию общего билирубина с 14,31±1,21 до 6,7±0,51 мкмоль/л), тем самым обеспечивает ускорение репаративных процессов и снижение интенсивности цитолиза.

9. Лекарственная форма силимарина конъюгированного с нано частицами селена при лечении поросят, больных токсической гепатодистрофией показала 100% терапевтическую эффективность. При этом установлено, что она обладает выраженными гепатопротекторными и детоксикационными свойствами, снижает концентрацию продуктов перекисного окисления липидов МДА с 16,7±1,92 нмоль/л до 4,11±0,46 нмоль/л, повышает активность антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы 19,8±1,86 до 23,18±1,98 мкмоль G-SH /л x мин, приводит к нормализации пигментного обмена (снижает концентрацию общего билирубина с 12,8±1,17 до 6,4±0,35 мкмоль/л), тем самым обеспечивает ускорение регенеративных процессов и снижение интенсивности цитолиза.

10. Применение комплексной схемы лечения токсической дистрофии печени у поросят, включающей лекарственную форму силимарина конъюгированного с наночастицами селена в дозе 0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней, инъекционную форму метилурацила - в дозе 0,1 мл/кг, 1 раз в день, 7 дней и витаминный комплекс «Волстар» 0,5 мл/10 кг с водой, 5 дней, приводит к повышению среднесуточных привесов на 30 %.

11. Применение комплексной схемы лечебно-профилактических мероприятий поросятам отъемного периода, включающей применение лекарственной формы силимарина конъюгированного с наночастицами селена, инъекционной формы метилурацила и витаминного комплекса «Волстар» приводит к увеличению среднесуточного прироста массы тела 28 %, снижению заболеваемости на 16,6 %, повышению сохранности на 3,3 %.

12. Экономическая эффективность от применения комплексной схемы включающей препарат силимарина конъюгированный с наночастицами селена в дозе 0,1 мг/кг, внутримышечно, двукратно 1 раз в день с интервалом 7 дней,

мицеллярный раствор метилурацила в дозе 0,1 мг/кг, внутримышечно, двукратно 1 раз в день с интервалом 7 дней и витаминную кормовую добавку «Волстар» внутрь с питьевой водой, в объеме 0,5 мл на голову, 1 раз в день, 3 дня являются экономически выгодными для применения на свиноводческих комплексах. На каждый затраченный рубль на оказание профилактических мероприятий хозяйство получает 2,47 рубля прибыли.

Рекомендации производству

1. Для фармакологической коррекции гепатоза крупного рогатого скота лекарственную форму силимарина конъюгированного с нано частицами селена рекомендуется назначать в дозе 0,1 мл/кг, внутримышечно, 1 раз в день в течении 7 дней.

2. Для фармакологической коррекции токсической дистрофии печени у поросят отъемного периода рекомендуется применять следующую схему лечения: лекарственную форму силимарина конъюгированного с нано частицами селена в дозе 0,1 мл/кг, внутримышечно, 1 раз в день в течении 7 дней, инъекционную форму метилурацила в дозе 2 мг/кг (0,1 мл/кг по объему), 1 раз в день в течении 7 дней, витаминный комплекс «Волстар» из расчета 0,5 мл на 10 кг массы тела животного, с питьевой водой 5 дней.

3. Для профилактики токсической дистрофии печени у поросят отъемного периода рекомендуется применять следующую схему: лекарственную форму силимарина конъюгированного с нано частицами селена в дозе 0,1 мл/кг, внутримышечно, двукратно, до отъема и через 7 суток после отъема, инъекционную форму метилурацила в дозе 2 мг/кг (0,1 мл/кг по объему), двукратно, до отъема и через 7 суток после отъема, витаминный комплекс «Волстар» из расчета 0,5 мл на 10 кг массы тела животного, с питьевой водой 4 дня.

4. Для фармакологической коррекции патологий печени у собак рекомендуется назначать лекарственную форму силимарина конъюгированного с

нано частицами селена в дозе 0,1 мл/кг, внутримышечно, 1 раз в день 7 дней подряд.

5. Результаты исследования могут быть использованы в учебном процессе при подготовке студентов, магистров и аспирантов зооветеринарного профиля, при составлении научно-методических рекомендаций, в работе зооветеринарных специалистов и руководителей хозяйств.

Рекомендации и перспективы разработки темы

В результате проведенных исследований изучены механизмы взаимодействия коллоидных частиц металлической и не металлической структуры в составе лекарственного средства с внутренней средой организма. Опираясь на это можно целенаправленно разрабатывать методы коррекции патологических процессов в организме животных при этом минимизировать количество вводимых лекарственных средств для достижения терапевтического эффекта.

Доказана биологическая активность наночастиц селена в композиции с силимарином, что дает предпосылки для дальнейшего проведения исследований по созданию лекарственных препаратов с применением коллоидного селена в качестве транспортной системы биологически активных субстанций.

VI. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

WBC (white blood cells — белые кровяные тельца) — лейкоциты в абсолютных числах

RBC (red blood cells — красные кровяные тельца) — эритроциты в абсолютных числах

HGB (Hb, hemoglobin) — гемоглобин, концентрация в цельной крови

HCT (hematocrit) — гематокрит

PLT (platelets — кровяные пластинки) — тромбоциты в абсолютных числах

MCV -средний объем эритроцита

MCH – среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците

MCHC — средняя концентрация гемоглобина в эритроците

MPV (mean platelet volume) — средний объем тромбоцитов

PDW — относительная ширина распределения тромбоцитов по объёму

PCT (platelet crit) — тромбоцит

LYM% (LY%) (lymphocyte) — относительное содержание лимфоцитов.

LYM# (LY#) (lymphocyte) — абсолютное содержание лимфоцитов.

MID% — относительное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов.

MID# — абсолютное содержание смеси моноцитов, базофилов и эозинофилов.

GRA% — относительное (%) содержание гранулоцитов.

GRA# — абсолютное содержание гранулоцитов.

RDW-SD — относительная ширина распределения эритроцитов по объёму.

RDW-CV — относительная ширина распределения эритроцитов по объёму.

P-LCR — коэффициент больших тромбоцитов.

АЛТ – аланинаминотрансфераза.

АСТ – аспартатаминотрансфераза.

γ-ГТФ – гаммаглутамилтрансферазы.

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

МДА – малоновый диальдегид

VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулаев, Ш.М. Этиология токсической гепатодистрофии поросят на промышленных комплексах/ Ш.М. Абдулаев // Ветеринарные проблемы промышленного животноводства: тезисы докладов республиканской науч.-практической конференции. - Белая Церковь, 1985. - № 2. - С. 8-9.
2. Абдуллаев, Ш.М. Токсическая гепатодистрофия поросят / Ш.М. Абдуллаев // Ветеринария. - 1985. - №2. - С.61-68.
3. Алехин, Ю.Н. Болезни печени у высокопродуктивных коров (диагностика, профилактика и терапия) / Ю.Н. Алехин // Ветеринария. – 2011. - №6. – С. 3-7.
4. Альбанова В.И. "Ретиноиды": наука и производство /В.И. Альбанова, К.С. Гузев, К.В. Ноздрин//Фармация. – 2007. - №7. – С. 36–37.
5. Андрейцев, М.З. Клиническая оценка функциональных проб печени у продуктивных коров при гепатозе / М.З. Андрейцев //Актуальные проблемы патологии животных: Мат-лы междунар. съезда терапевтов, диагностов. – Барнаул: Изд-во АГАУ, 2005. – С. 16-18.
6. Байгурина С.Ж. Применение 1 % раствора метилурацила в комплексном лечении пародонтита/С.Ж. Байгурина, Б.С. Кушербаев, Р.А. Майжанова, З.О. Сембиева // Здравоохранение Казахстана. – 1991 – №11. – С. 42–43.
7. Байматов, В.Н. Метаболизм у коров с нарушением функции печени / В.Н. Байматов // Ветеринария. - 1982. - № 8. - С. 50 - 52.
8. Байматов, В.Н. Оценка проб для определения функционального нарушения печени / В.Н. Байматов, С.М. Муха // Ветеринария. - 1981. - № 6. - С. 66.
9. Балым, Ю.П. Влияние препаратов селена на продуктивность крупного рогатого скота и качество мяса/ Ю.П. Балым, В.И. Беляев, С.В. Шабунин// Все о мясе. – 2007. - №2. – С. 36-37.

10. Баранов, Н.П. Диагностическое значение определения изоферментов аспаратаминотрансферазы, малатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, алкогольдегидрогеназы и холинэстеразы в сыворотке крови при заболеваниях печени: автореф. дисс. ... канд. вет. наук: 16.00.01 / Баранов Николай Петрович. - М., 1984. - 22 с.
11. Батрак, Г.Е. Дозирование лекарственных средств экспериментальным животным / Г.Е. Батрак, А.Н. Кудрин. – М, 1979. – 168 с.
12. Белоусова Т.А. Читая Бабухина/Т.А. Белоусова // В сб.: Ретиноиды. – М.: изд. ЗАО "Ретиноиды", 2007 – Вып. 25 – С. 3–7.
13. Белоусова Т.А., Морфологические показатели состояния белой пульпы селезёнки при воздействии 6-метилурацила на организм/ Т.А. Белоусова, А.Н. Яцковский // Морфология. - 2000 – Т. 117, № 3 – С. 22
14. Беляев В.А. Биологическая роль селена и селенодефициты у животных и птиц: монография / В.А. Беляев, В.А. Оробец, И.В. Киреев - Ставрополь, 2009. – 163 с.
15. Билич Г.Л. Влияние некоторых пуриновых и пиримидиновых производных на синтетические и пролиферативные процессы в регенерирующем лёгком после левосторонней пневмонэктомии/ Г.Л. Билич, В.Н. Отмахов// Пиримидиновые производные и их применение в биологии и медицине / под ред. Г.Л. Билича и В.Э. Коллы: Межвуз. сб. –Йошкар-Ола, 1979 – С. 33–77.
16. Блуаз-Бриде, Н. Дополнительные методы клинического исследования печени у собак и кошек / Н. Блуаз-Бриде // Ветеринар. – 1999. - № 3-4. – С. 14-22.
17. Буреш Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения/Я.Буреш, О. Бурешова, Д.П. Хьюстон. - М.: Высш. шк., 1991. – 399 с.
18. Бурлакова, Е.Б. Перекисное окисление липидов мембран и природные антиоксиданты / Е.Б. Бурлакова, Н.Г. Храпова // Успехи химии. – 1985. – Т. 54, № 9. – С. 1540-1588.
19. Венгеровский, А.И. Доклиническое изучение гепатопротективных средств: метод. рек. Рос. фарм. государственного комитета МЗ РФ /А.И. Венгеровский, И.В. Маркова //Ведомости фарм. комитета. - 1999. - С. 10-24.

20. Виноградова, Л.Ф. Восстановление экскреторной функции печени антиоксидантами при токсическом гепатите / Л.Ф. Виноградова, Ж.А. Мирзоян, Е.В. Харлицкая, Н.С. Манякина // Вестник РУДН, серия Медицина. – 2000. - №2. - С. 53 – 55.
21. Владимиров, Ю.А. Биологические мембраны и незапрограммированная смерть клетки/ Ю.А. Владимиров// Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т.6. - №9. – С. 2 – 9.
22. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т.6. - №9. – С. 13 –19.
23. Власова, С.Н. Моноксигеназная система печени при хроническом гепатите по данным антипиринового теста / С.Н. Власова, И.А. Переслечина, Е.И. Шабунина // Клиническая лабораторная диагностика. - 1993. -№ 4.-с.41-43.
24. Волощенко О.И. Влияние метилурацила на интенсивность анаболических процессов у интактных крыс // Регуляция воспаления и регенерации в хирургии / под ред. В.И. Русакова: Матер. Всесоюз. симп. – Ростов н/Д., 1976 – С. 87–89.
25. Воромин, М.В. Общий антиоксидантный статус плазмы крови здоровых доноров, получавших витаминно-минеральный комплекс / М.В. Воромин [и др.]// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – № 5. – С. 524–526.
26. Гарбузенко, Д.В. Механизмы компенсации структуры и функции печени при ее повреждении и их практическое значение/Д.В. Гарбузенко // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2008. – Т. 18, № 6. – С.14–21.
27. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. - Новосибирск: Наука. Сиб. отделение. – 1990. - 333 с.

28. Гонский, Я.И. Роль антиоксидантной системы в патогенезе токсического гепатита / Я. И. Гонский, М.М. Корда, И.Н. Клиш // Патологическая физиол. эксп. тер. – 1996. – № 2. – С. 43–45.
29. ГОСТ 12.1.007-76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями N 1, 2). – М: Стандартинформ, 2007. – 7 с.
30. ГОСТ 7.32-2001. Межгосударственный стандарт. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления. – М: Стандартинформ, 2006. – 22 с.
31. Государственная фармакопея Российской Федерации XII, ч. 1, 25. Аномальная токсичность (ОФС 42-0060-07), 2012.
32. Грецкий В.М., Цагарейшвили Г.В. Носители лекарственных веществ в мазях/ В.М. Грецкий, Г.В. Цагарейшвили. - Тбилиси: Мецниереба, 1979 – 203 с.
33. Гринь В.А. Токсикологическая оценка препарата селенолин /В.А. Гринь, В.А. Антипов, Т.Н. Родионова//Труды КубГАУ, - 2011. - С.151-156.
34. Гринь, В.А. Профилактическая эффективность селенолина при гипоселенозе телят /В.А. Гринь, Т.Н.Родионова, Д.О. Москвичева //Труды КубГАУ, - 2011. С.147-151.
35. Давыдов, В.В. Особенности свободнорадикальных процессов в печени взрослых и старых крыс при стрессе / В.В. Давыдов, И.В. Захарченко, В.Г. Овсянников // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 137, № 2. – С. 160–163.
36. Демина, Н.Б. Фармакотерапия заболеваний гепатобилиарной системы / Н.Б. Демина [и др.] // Российский медицинский журнал – 2007. – № 2. – С. 43–46.
37. Денисенко, В.Н. Диагностика, лечение и профилактика болезней печени у животных / В.Н. Денисенко: Лекция. - М.: МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2002. – 50 с.
38. Десятник, В.И. Диагностика и профилактика гепатоза у бычков на откорме / В.И. Десятник, А.В. Жаров, Т.В. Александрова // Современные вопросы

ветеринарной медицины и биологии: Сб. науч. тр. по матер. первой междунар. конф. – Уфа, 2000. – С. 126-127.

39. Десятник, В.И. Морфофункциональное состояние печени и цитохимические показатели крови бычков при гепатозе/ В.И. Десятник // Актуальные проблемы интенсификации животноводства и подготовки специалистов: Мат-лы науч. и метод. конф. - Троицк, 1990. - С. 81-82.

40. Джавахян, М.А. Анализ рынка современных средств гепатопротекторного действия / М. А. Джавахян, Ю.С. Канунникова // Вопросы биол. мед. и фармацевт. химии. – 2012. – №11. – С. 63– 65.

41. Джанашия, М. М. Антиоксиданты в физиологических и патологических процессах жизнедеятельности организма / М. М. Джанашия [и др.]; под ред. Э. К. Айламазяна. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2001. – 64 с.

42. Дубинская, В.А. Биотест-системы для первичного скрининга и оценки действия веществ с антиоксидантной активностью / В.А. Дубинская, М.Ф. Минеева, Л.Б. Ребров, В.А. Быков // Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. – 2007. – № 4. – С. 16–20.

43. Дудин, В. И. Биохимия витамина Е и связанных с ним биологически активных веществ / В. И. Дудин. - М.: РАСХН. - 2004. - 256 с.

44. Душкин, Е.В. Жировая дистрофия печени у молочных коров (Методическое пособие) / Е.В. Душкин. – Краснодар. – 2012. – 28 с.

45. Душкин, Е.В. Молочная продуктивность и состояние печени после отела по результатам применения препарата Антитокс / Е.В. Душкин // Зоотехния. – 2008. - № 7. – С. 21-22.

46. Душкин, Е.В. О связи между функцией молочной железы и жировой дистрофией печени у высокопродуктивных коров / Е.В. Душкин //Сельскохозяйственная биология. Серия: Биология животных. – 2010. - № 2. – С. 18-24.

47. Душкин, Е.В. Перкуторная диагностика липидоза печени у коров и лечение его препаратом «Антитокс» / Е.В. Душкин // Научнопрактический

конгресс «Актуальные проблемы ветеринарной медицины». – Санкт-Петербург, – 2007. – С. 90-93.

48. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.). [Электронный ресурс] http://uristu.com/library/konventsii/konvenciy_571/ (дата обращения: 17.11.2013).

49. Емельянов, В.В. Лекарственный гепатит у поросят / В.В. Емельянов, И.З. Севрюк // Ученые записки Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины. - Витебск, 2005. т. 41, ч. 1. - с. 46-49.

50. Жаров, А.В. Морфофункциональные изменения у коров при патологическом обмене веществ (кетоз, остеодистрофия, ожирение) /А.В. Жаров, В.Д. Илеиш //Новое в диагностике, профилактике и лечении животных. - М., 1996. - С. 58-63.

51. Жаров, А.В. Патология обмена веществ у высокопродуктивных коров / А.В. Жаров, Ю.П. Жарова // Ветеринария. – 2012. - №9. – С. 46-50.

52. Зайцев, В.Г. Модельные системы перекисного окисления липидов и их применение для оценки антиоксидантного действия лекарственных препаратов: автореф. дис. канд. биол. наук. – Волгоград, 2001. – 22 с.

53. Зайцев, С.Ю. Биохимия животных. Фундаментальные и клинические аспекты / С.Ю. Зайцев, Ю.В. Конопатов. - СПб.: Издательство «Лань», 2004. - 384 с.

54. Зелди И.П. Характеристика метаболизма некоторых биополимеров и сравнительная оценка эффективности совместного влияния оротата калия и рибоксина на регенераторные процессы в коже и лёгком крыс/ И.П. Зелди// Пиримидиновые производные и их применение в биологии и медицине / под ред. Г.Л. Билича и В.Э. Коллы: Межвуз. сб. –Йошкар-Ола, 1979 – С. 95–20.

55. ит, И.Н. Печень и иммунологическая реактивность / И.Н. Алексеева, Т.М. Брызгина, С.И. Павлович. – Киев.: Наукова Думка, 1991. –168 с.

56. Калюжный, И. И. Поражение печени у высокопродуктивных коров при нарушении обмена веществ / И. И. Калюжный, Н. Д. Баринов // Вестник Саратовского ГАУ им. Н. И. Вавилова. - 2013. - № 8. - С. 7-11.

57. Калюжный, И.И. Адипозно-гепатический жировой синдром / И.И. Калюжный, Н.Д. Баринов, Е.В. Рябова // Ветеринарная медицина: мат-лы междунар. науч.-практ. симпозиума; под ред. А.А. Волкова. – Саратов: Наука, 2011. – С. 231-238.

58. Калюжный, И.И. Клиническая гастроэнтерология животных: учебное пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности «Ветеринария» /И.И. Калюжный; под ред. А.Ф. Кузнецова. - Санкт - Петербург: Лань. - 2007. - 544 с.

59. Калюжный, И.И. Лечебно-профилактические мероприятия жирового гепатоза у молочных коров голштино-фризской породы / И.И. Калюжный [и др.]// Современные способы повышения продуктивных качеств сельскохозяйственных животных, птицы и рыбы в свете импортозамещения и обеспечения продовольственной безопасности страны: мат-лы междунар. науч.-практич. конф., посвящ. 85-летию со дня рождения д. с.-х. наук, профессора А.П. Коробова, Саратов, 14-16 мая 2015 г. / Под ред. А.В. Молчанова, А.А. Васильева. – Саратов: изд. «Научная книга», 2015. – С. 80-86.

60. Калюжный, И.И. Метаболические нарушения у высокопродуктивных коров / И.И. Калюжный, Н.Д. Баринов, А.В. Коробов. – Саратов, 2010. – 104 с.

61. Калюжный, И.И. Патология обмена веществ у импортного молочного скота / И.И. Калюжный, Н.Д. Баринов, А.Г. Смольянинов // Вестник Саратовского ГАУ им. Н.И. Вавилова. - 2012. - № 1. - С. 23-26.

62. Калюжный, И.И. Факторы, влияющие на сохранность новорожденных телят / И.И. Калюжный, Н.Д. Баринов // Ветеринарная медицина. Современные проблемы и пути развития: мат-лы междунар. науч.-практич. конф. / Под ред. А.А. Волкова. – ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2010. – С. 192-193.

63. Камышников, В. С. Клинические лабораторные тесты от А до Я и их диагностические профили/ В.С. Камышников. – М.: МЕДпресс-информ, 2005. – 320 с.
64. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.
65. Караулов А.В. Иммуноterapia инфекционных болезней: проблемы и перспективы/А.В. Караулов, О.В. Калюжин//Терапевтический архив. – 2013. - №11: - С. 100–108.
66. Карташова, О.Я. Функциональная морфология печени / О.Я. Карташова, Л.А. Максимова. - СПб.: Тригон, 2000. - 118 с.
67. Кесарева, Е.А. Биохимические показатели сыворотки крови собак при болезнях печени / Е.А. Кесарева, В.Н. Денисенко //Ветеринария. – 2004. – №3. – С. 48-50.
68. Кинзирская, Ю.А. Гепатотоксическое действие лекарственных препаратов некоторых фармакологических групп / Ю.А. Кинзирская [и др.]// Клинич. медицина. – 2003. – № 10. – С. 11–16.
69. Киреев, И.В. Влияние метабисела на динамику диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в крови телят / И.В. Киреев, В.А. Оробец, В.А. Беляев, В.С. Скрипкин, Т.С. Чернова // Вестник ветеринарии. - 2013. - № 3 (66). - С. 75-76.
70. Кириллов, А.А. Показатели крови коров при болезнях печени / А.А. Кириллов, П.Н. Юшманов, А.Я. Батраков // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2015. - №1. – С. 86-90.
71. Кишкун, А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 800 с.
72. Клебанов, Г.И. Антиоксидантная активность. Методы исследования/ Г.И. Клебанов // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2001. – Т. 11. - № 4, прил. № 14. – С. 109–118.
73. Коваленко Д.О. Клинико-экспериментальное обоснование применения витахола для профилактики и лечения гепатоза поросят : автореф.

дис. ... канд. вет. наук: 06.02.01 / Коваленко Денис Олегович. – Белгород, 2012. – 21 с.

74. Коржевский, Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2005. – 608 с.

75. Королёва, Л.Р. Современные гепатопротекторы/Л.Р. Королева// Российский медицинский журнал. – 2005. – № 2. – С. 35–37.

76. Корочкина, Е.А. Витаминно-минеральные препараты при нарушении обмена веществ у высокопродуктивных коров/ Е.А. Корочкина // Ветеринария. – 2012. - №7. – С. 51-54.

77. Корочкина, Е.А. Обмен веществ у высокопродуктивных коров при введении витаминно-минеральных болюсов пролонгированного действия / Е.А. Корочкина // Генетика и разведение животных. – 2014. - №1. – С. 29.

78. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина/ В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.И. Ковалева // Вопросы мед. химии. – 1990. – № 2. – С. 88–91.

79. Котельникова, С.В. Состояние перекисного окисления липидов в разных органах и тканях белых крыс в зимний и летний периоды в условиях кадмиевой интоксикации / С.В. Котельникова, Н.Г. Соколова, А.В. Котельников // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 9. – С. 264–265.

80. Кравченко, Л.В. Исследование антиоксидантных свойств индол-3-карбинола *in vitro* и *in vivo* / Л.В. Кравченко [и др.]// Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. – 2008. – № 4. – С. 18–23.

81. Кравченко, Л.В. Сравнительная оценка антиоксидантной активности фикоцианина и селенфикоцианина *in vitro* и *in vivo* / Л.В. Кравченко [и др.]// Вопросы питания. – 2006. – Т. 75, № 6. – С. 18–22.

82. Кравченко, Л.В. Характеристика острого токсического действия четыреххлористого углерода как модели окислительного стресса/Л.В. Кравченко и др.//Токсикологический вестник. – 2009. - №1. - С. 12 – 17.

83. Краснюк, И.И. (мл.) Повышение биодоступности малорастворимых лекарственных веществ с помощью твёрдых дисперсий с полиэтиленгликолем / И.И. Краснюк (мл.) [и др.]// Рос. мед. журн. – 2005. – № 6. – С. 34–37.
84. Крепкова, Л.В. Экспериментальное и клиническое изучение фитопрепаратов из расторопши пятнистой / Л.В. Крепкова, А.А. Шкаренков, Т.А. Сокольская // Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. – 2008. – № 4. – С. 3–6.
85. Кузнецов, Н.И. Биологически активные вещества для профилактики и лечения болезней нарушения обмена веществ и нормализации функции печени у животных / Н.И. Кузнецов // Итоги и перспективы научных исследований по проблемам патологии животных и разработке средств и методов терапии и профилактики: мат-лы координац. совещания. – Воронеж: ВНИВИПФиТ, 1995. – С. 41-45.
86. Кузнецов, Н.И. Новые препараты для профилактики токсической гепатодистрофии и лечения животных / Н.И. Кузнецов // Ветеринария. – 1990. - № 3. – С. 9-11.
87. Кузнецов, Н.И. Этиология и проявление гепатозов у крупного рогатого скота / Н.И. Кузнецов [и др.]// Пути повышения продуктивности животных. Выпуск 4: матер. науч.-практ. конф. профессорско-преподавательского и аспирантского состава зооинженерного и ветеринарного факультетов. - Воронеж: Истоки, 1998. - С. 62-64.
88. Кузнецов, С.Г. Биохимические критерии полноценности кормления животных / С.Г. Кузнецов, Т.С. Кузнецова, А.С. Кузнецов // Ветеринария. - 2008. - №4. - С. 3-9.
89. Кузьминова, Е.В. Нормализация функции печени у крупного рогатого скота / Е.В. Кузьминова, И.С. Жолобова, А.Г. Зафириди // Ветеринарный консультант. – 2006. - №8. - С.8-9.
90. Кушнерова, Н.Ф. Влияние интоксикации оксидами азота на метаболические реакции печени и профилактика поражений / Н.Ф. Кушнерова, Ю.А. Рахманин // Гигиена и санитария. – 2008. – № 1. – С.70–72.

91. Кушнерова, Н.Ф. Влияние стресса на состояние липидного и углеводного обмена печени, профилактика / Н.Ф. Кушнерова, В.Г. Спрыгин, С.Е. Фоменко, Ю.А. Рахманин // Гигиена и санитария. – 2005. – № 5. – С. 17–21.
92. Кушнерова, Н.Ф. Гепатопротекторные свойства изофлавоноидов из корней *Maackia Amurensis* при экспериментальном поражении печени четыреххлористым углеродом / Н.Ф. Кушнерова [и др.]// Эксперим. и клинич. фармакология. – 2014. – Т. 77, № 2. – С. 26–30.
93. Ланкин, В.З. Влияние ингибиторов β -гидрокси- β -метилглутарилкоэнзим А-редуктазы и витаминов-антиоксидантов на свободнорадикальное окисление липидов печени крыс / В.З. Ланкин [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2007. – Т. 143, № 4. – С. 390–393.
94. Ларькина, М.С. Антиоксидантная активность экстракта василька шероховатого при токсическом поражении печени крыс / М.С. Ларькина [и др.] // Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. – 2011. – № 8. – С. 25–28.
95. Леонидов Н.Б. Влияние полиморфизма метилурацила на состав липидов и антиоксидантов в тканях крыс/ Н.Б. Ларькина, Е.Б. Романенко, А.В. Лебедев // Вопр. мед. хим. – 1995– Т. 41, №2. – С. 32–35.
96. Литвицкий, П. Ф. Патологическая физиология: учеб.: в 2 т. - 3-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2006. – Т. 2. – 808 с.
97. Луценко, Е.В. Получение и изучение антигепатотоксической активности наносомной формы флаволигнана силикристина / Е.В. Луценко [и др.]// Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. – 2008. – № 6. – С. 19–23.
98. Макаридзе, Л.А. Некоторые особенности патоморфологических изменений у свиней при гепатодистрофиях/ Л.А. Макаридзе, З.А. Макаридзе // Актуальные проблемы диагностики, терапии и профилактики болезней домашних животных: матер. междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 80-летию факультета ветеринарной медицины ФГОУ ВПО «ВГАУ им. К.Д. Глинки». – Воронеж: ФГОУ ВПО ВГАУ, 2006. – С.204-206.

99. Макаров, В.Г. Изучение механизма антиоксидантного действия витаминов и флавоноидов / В.Г. Макаров, Н.М. Макарова, А.И. Селезнева // Вопросы питания. – 2005. – Т. 74, № 1. – С. 10–13.
100. Макляков Ю.С. Новые пиримидины-стимуляторы регенерации/Ю.С. Макляков [и др] //Биомедицина. - 2006. -№ 2. -С. 117-121.
101. Маракулина К.М. Взаимодействие природных фосфолипидов с антиоксидантами нового класса – изоборнилфенолами: Дис ... канд. хим. наук: 02.00.04. – Москва, 2016. – 132 с.
102. Машковский, М.Д. Лекарственные средства/М.Д. Машковский. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: Новая волна, 2010. – 1216 с.
103. Медицинские лабораторные технологии / под ред. А. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 2002. – Т. 2. – 408 с.
104. Меньщикова, Е. Б. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания / Е. Б. Меньщикова [и др.]. – Новосибирск: АРТА, 2008. – 284 с.
105. Мерзленко, Р.А. Влияние гепатоника и экстракта сапропеля на клиническое состояние и уровень обменных процессов у новотельных коров при гепатозе / Р.А. Мерзленко, Р.А. Добрунов // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. - 2014. - № 8. - С. 61-63.
106. Мерзленко, Р.А. Влияние гепатоника и экстракта сапропеля на клинический статус и физиологическое состояние коров при гепатозе / Р.А. Мерзленко, Р.А. Добрунов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2013. - Т. 214. - С. 277-281.
107. Мерзленко, Р.А. Влияние катозала, ковертала и янтарной кислоты на биохимические и продуктивные показатели свиноматок, больных гепатозом / Р.А. Мерзленко, И.В. Бабанин, А.Н. Мусохранова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. - 2014. - № 3 (113). - С. 93-97.
108. Мерзленко, Р.А. Гепатоз у лактирующих коров и его клинико-биохимические корреляты / Р.А. Мерзленко, М.Н. Заздравных, В.В. Дронов, Г.И. Горшков / Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. - 2012. - № 6. - С. 78-80.

109. Мерзленко, Р.А. Гепатозы свиней – диагностика, лечение и профилактика / Р.А. Мерзленко // Ветеринарный вестник. 2011. № 6 (111).

110. Мерзленко, Р.А. Клинико-гематологические показатели и морфофункциональное состояние печени коров при гепатозе / Р.А. Мерзленко, Р.А. Добрунов, Н.П. Зуев, В.Н. Позднякова // Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. - 2013. - № 2 (27). - С. 104-109.

111. Мерзленко, Р.А. Профилактика гепатозов свиней с применением катозала, ковертала и янтарной кислоты / Р.А. Мерзленко, И.В. Бабанин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2013. - Т. 214. - С. 282-286.

112. Мерзленко, Р.А. Профилактика гепатозов у поросят-отъемышей с применением энтеросорбента «Алвисорб – Гель Энтеральный» / Р.А. Мерзленко, И.В. Бабанин, А.И. Сотниченко, В.В. Оханов, А.А. Степанов, Н.А. Стрельников / Свиноводство. - 2013. - № 8. - С. 57-59.

113. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник/ Под ред. И. П. Кондрахина. - М.: Колос, 2004. - 520 с.

114. Мильто, И.В. Электронно-микроскопическое исследование печени крыс после внутривенного введения суспензии наноразмерного магнетита / И.В. Мильто, И.В. Суходоло, А.А. Миллер. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2012. – Т. 153, № 4. – С. 510–513.

115. Мироджов, Г.К. Клеточный иммунитет и апоптоз гепатоцитов при хронических холестатических гепатитах / Г.К. Мироджов [и др.]// Клинич. медицина. – 2005. – № 10. – С. 30–33.

116. Миронова, Г.Д. Влияние некоторых флавоноидсодержащих препаратов растительного происхождения на активность митохондриального АТФ-зависимого калиевого канала / Г.Д. Миронова [и др.]// Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – Т. 146, № 8. – С. 195–199.

117. Мищенко, В.А. Анализ причин заболеваний высокопродуктивных коров / В.А. Мищенко // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2008. – Т. 11, №2. - С. 20-24.

118. Мищенко, В.А. Основные причины выбытия высокопродуктивных коров / В.А. Мищенко, Н.А. Ярёмченко, Д.К. Павлов // Ветеринария. – 2004. - №10. - С. 15-17.
119. Мищенко, В.А. Проблема патологии печени у высокопродуктивных коров / В.А. Мищенко, А.В. Мищенко // Ярославский агровестник. – 2015. - №1. – С. 16-17.
120. Моисеев, В.С. Лекарственная гепатотоксичность/В.С. Моисеев// Клинич. фармакология и терапия. – 2005 б. – Т. 14, № 1. – С. 10 – 14.
121. Моисеев, В.С. Проблемы клинических исследований новых лекарств как основы современной медицины, основанной на доказательствах/В.С. Моисеев // Терапевт. арх. – 2008. – Т. 80, № 12. – С. 5–10.
122. Мохов, О.И. Критерии научной достоверности при планировании и оценке результатов клинических испытаний / О.И. Мохов // Клиническая фармакология и терапия. - 1999. - № 5. - С. 75-80.
123. Мухина, Н.В. Корма и биологические кормовые добавки для животных / Н.В. Мухина. - М.: КолосС, 2008. - 271 с.
124. Надальяк, Е.А. Энергетический обмен у лактирующих коров / Е.А. Надальяк, В.В. Решетов // Животноводство. – 1978. – №1. – С. 53-56.
125. Накусов, Т.Т. Влияние антиоксидантов на морфологическую структуру внутренних органов крыс при острой гипоксии / Т.Т. Накусов [и др.]// Вопросы питания. – 2005. –Т. 74, № 5. – С. 22–23.
126. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 10993-10-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследования общетоксического действия. Москва Стандартинформ, - 2010. – 27 с.
127. Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными. Москва Стандартинформ, - 2009. – 16 с.

128. Немцова, Е.Р. Антиоксиданты в интенсивной терапии / Е.Р. Немцова [и др.]// Рос. мед. журн. – 2006. – № 4. – С. 18–22.
129. Никитин, И.Г. Гепатопротекторы: мифы и реальные возможности / И.Г. Никитин // Фарматека. - 2007. - №13 (147). – С. 14–18.
130. Николаев, СМ. Растительные и лекарственные препараты при повреждениях гепатобилиарной системы / С.М. Николаев. – Новосибирск: Наука. - 1992. -С. 155.
131. Никулин, Б.А. Пособие по клинической биохимии / под ред. Л. В. Акуленко. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2007. – 256 с.
132. Никулин, И.А. Гепавет для профилактики гепатоза служебных собак / И.А. Никулин, А.С. Корчагина // Ветеринария. – 2013. - №8. – С. 47-50.
133. Никулин, И.А. Использование биологически активных веществ при гепатозе новорожденных телят / И.А. Никулин [и др.]// Пути повышения продуктивности животных. Выпуск 5: Матер. науч.-практ. конф. профессорско-преподавательского и аспирантского состава зооинженерного и ветеринарного факультетов. - Воронеж: Истоки, 1999. - С. 58-60.
134. Никулин, И.А. Клинико-иммунологический статус коров при гепатозе / И.А. Никулин, Ю.А. Шумилин, М.Ю. Нижегородов // Актуальные вопросы ветеринарной медицины: Матер. Сиб. междунар. вет. конгр. / Новосиб. гос. аграр. ун-т. – Новосибирск, 2005. – С. 324-325.
135. Никулин, И.А. Метаболическая функция печени у крупного рогатого скота при силосно-концентратном типе кормления и ее коррекция гепатотропными препаратами: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.01 / Никулин Иван Алексеевич; ВНИВИПФиТ. - Воронеж, 2002. - 46 с.
136. Никулин, И.А. Синдромный принцип диагностики болезней печени у крупного рогатого скота / И.А. Никулин, Г.Е. Копытина, М.Н. Кочура // Ветеринария. - 2008. - №1. - С.41-43.
137. Ноздрин В.И. Гистофармакологические исследования кожи/В.И. Ноздрин [и др.] // М.: изд. ЗАО "Ретиноиды", 2006 – 376 с.

138. Ноздрин В.И. Морфологические изменения кожи у экспериментальных животных под воздействием мочевины/В.И. Ноздрин [и др.] // Росс. журнал кожных и венерических болезней, 2008 – №3. –С. 63–68.
139. Ноздрин В.И. Морфометрическая характеристика эпидермиса крыс в условиях длительного воздействия 6-метилурацила/ В.И. Ноздрин, Т.А. Белоусова, А.Н. Яцковский//Морфология. – 2000 – Т.117, № 3 – С. 90–91.
140. Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных: справ. пособие / под ред. А. П. Калашникова [и др.]. – 3-е изд., перераб. и доп. – Москва, 2003. – 456 с.
141. Оковитый, С.В. Гепатопротекторы: руководство / С.В. Оковитый [и др.]. – М.: ГОЭТАР – Медиа, 2010. – 112 с.
142. Оковитый, С.В. Гепатотропные средства: современное состояние проблемы / С.В. Оковитый, Д.С. Суханов, М.Г. Романцов // Терапевт. арх. – 2012. – № 2. –С. 62–68.
143. Оковитый, С.В. Исследование гепатопротекторного эффекта бемитила на модели длительного токсического поражения печени / С.В. Оковитый [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – Т. 69, № 2. – С. 52–54.
144. Оковитый, С.В. Клиническая фармакология антигипоксантов и антиоксидантов / С.В. Оковитый, С.Н. Шуленин, А.В. Смирнов. – СПб.: ФАРМиндекс, 2005. – 72 с.
145. Оробец, В.А. Болезни пищеварительной системы молодняка сельскохозяйственных животных / В.А. Оробец, В.А. Беляев, И.И. Летов, И.В. Киреев / Ставрополь, - 2012.
146. Осиков, М.В. Влияние $\alpha 1$ -кислого гликопротеина на процессы свободно радикального окисления при экспериментальной печеночной недостаточности /М.В. Осиков// Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 7. – С. 29-31.
147. Павлов, М.Е. Клиническая оценка исследований функции печени у коров / М.Е. Павлов [и др.]// Проблемы сельскохозяйственного производства на

современном этапе и пути их решения: тез. докл. IV междунар. науч.- производ. конф. – Белгород: издат-во Белгородской ГСХА, 2000. – С. 109-110.

148. Пальмина, Н.П. Действие биологически активных веществ в сверхнизких концентрациях на физико-химические свойства мембран *in vitro* / Н.П. Пальмина [и др.] // Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. – 2004. – № 4. – С. 31–37.

149. Пейсак, З. Болезни свиней/З. Пейсак; пер. с польского Д. В. Потапчука.- Брест: ОАО «Брестская типография», 2008.- 424 с.8.

150. Перекисное окисление липидов, его значение в патогенезе болезней животных, пути коррекции: монография / С. С. Абрамов [и др.]. - Витебск: ВГАВМ, 2007. -154 с.

151. Перцов, С.С. ПОЛ в головном мозге и печени крыс при острой стрессовой нагрузке и введении мелатонина / С.С. Перцов, Г.В. Пирогова // Бюллетень экспериментальной биологии медицины. – 2004. – № 7. – С. 19–23.

152. Петрович, Ю.А. Биоритмы активности дегидрогеназ печени, крови и изменения массы тела крыс при обычном корме и при избытке сахарозаменителей / Ю.А. Петрович [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2007. – Т. 144, № 12. – С. 686–689.

153. Петровский, С. В., Взаимосвязь незаразных патологий у поросят, содержащихся в условиях промышленного комплекса/ С.В. Петровский, Н.К. Хлебус, В. Н Целобёнок // Учёные записки ВГАВМ – 2011. – Т.47. - Вып.1. - С.221-223.

154. Петрушенко, Ю.Н. Биологически активные вещества в рационах молодняка свиней / Ю.Н. Петрушенко//Сб. науч. тр. IV Международной научно практической конференции по свиноводству «Современные проблемы интенсификации производства свинины» 11-13 июля 2007. - С. 282-287.

155. Печерская, Н.В. Сравнительная характеристика антиоксидантов растительного происхождения в составе жировых эмульсионных продуктов / Н.В. Печерская, В.Г. Байков, А.А. Кочеткова, В.В. Бессонов // Вопросы питания. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 20–22.

156. Плетнева, Т.В. Токсикологическая химия: учеб. для вузов 2-е изд./Т.В. Плетнева. – М.: ГЭОТАР–Медиа, 2005. – 512 с.

157. Погребняк, О. В. Морфологические и биохимические показатели крови при гепатодистрофии у поросят / О. В. Погребняк, В. С. Слободяник, С. М. Сулейманов // Новые фармакологические средства для животноводства и ветеринарии: мат-лы конф., поев. 55-летию Краснодарской НИВС. – 2001.- Т. 2 - С. 102-103.

158. Подольская, С.В. Создание липосомных препаратов антибиотика гелиомицина и их противоопухолевая активность / С.В. Подольская [и др.] // Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. – 2004. – № 3. – С. 33–37.

159. Позднякова В.Н. Иммунный статус у коров при гепатозе / В.Н. Позднякова, Р.А. Мерзленко // В сборнике: Проблемы и перспективы инновационного развития агроинженерии, энергоэффективности и IT-технологий Материалы XVIII Международной научно-производственной конференции. - 2014. - С. 76.

160. Покровский, А.А. Биохимические методы исследования в клинике. – М., 1969. – С. 206–210.

161. Покровский, В.М. Оценка эффективности лекарственных препаратов / В.М. Покровский, О.Г. Компаниец // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 6. – С. 668–670.

162. Полунина, Т.Е. Лекарственные поражения печени/Т.Е. Полунина // Лечащий врач. – 2005 б. – № 3. – С. 69–72.

163. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 г. №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)»

164. Правило лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения и социального развития// Собрание законодательства Российской Федерации. – 2010. - N 16. - ст. 1815. - N 31. - ст. 4161.

165. Применение селена в онкологии / И.Н.Огнерубова [и др.]//Современная онкология. - 2009 – Вып.2.
166. Прозоровская, Н.Н. Антиоксидантная активность льняного масла / Н.Н. Прозоровская [и др.]// Вопросы питания. – 2003. –Т. 72, № 2. – С. 13–18.
167. Пронин, В.В. Характеристика морфологических и биохимических показателей крови телят черно-пестрой породы под влиянием йода и селена / В.В. Пронин, С.П. Фисенко, А.В. Пронин // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2010. - Т. 201. - С. 316-319.
168. Рогожин, В.В. Биохимия животных: Учебник / В.В. Рогожин. – СПб.: ГИОРД, 2009. – 552 с.
169. Ролдугина, Н.П. Практикум по цитологии, гистологии и эмбриологии / Н.П. Ролдугина, В.Е. Никитченко, В.В. Яглов // Учебное пособие, Колос, 2004. – С. 6-8.
170. Роменский, Р.В. Влияние препарата «АДЕ-СЕЛЕН» на функциональное состояние печени новорожденных телят / Р.В. Роменский, Н.В. Роменская, В.А. Василенко // Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения: мат-лы VI междунар. научно-произв. конф. – Белгород, 2002. – С. 140.
171. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая/под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, - 2012. – 944 с.
172. Рустамова, Р.П. Влияние некоторых флавонов на энергетический метаболизм митохондрий (сообщ. 2) / Р.П. Рустамова [и др.]// Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. – 2004. – № 2. – С. 16–20.
173. Рябова, Е.В. Адипозно-гепатический синдром у высокопродуктивных молочных коров / Е.В. Рябова [и др.] // Ветеринарная медицина XXI века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития: Материалы Международной научно-практической конференции. Под редакцией А.А. Волкова. – Саратов, 2012. - С. 272-275.

174. Савойский, А.Г. Метаболизм у коров с нарушением функции печени / А.Г. Савойский, А.Н. Кушнирская, В.Н. Байматов // Ветеринария. – 1982. - № 8. – С. 50-52.
175. Сазонтова, Т.Г. Значение баланса прооксидантов - равнозначных участников метаболизма / Т.Г. Сазонтова, Ю.В. Архипенко // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2007. – № 3. – С. 2–18.
176. Сайфульмулюков, Э. Р. Токсикологическая оценка и фармакологическое обоснование применения препарата Е-селен при интенсивном выращивании и откорме бычков: дисс.. канд. вет. наук: 16.00.04/ Сайфульмулюков Эрнест Раисович, Троицк, 2006. – 132 с.
177. Саканян Е.И., Ковалева Е.Л., Митькина Л.И., Биченова К.А. Государственная фармакопея РФ XIII издания: лекарственные формы и их испытания/ Е.И. Саканян [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 9-1. – С. 111-115.
178. Самигуллина, Л.И. Новые перспективы применения препаратов расторопши пятнистой/ Л.И. Самигуллина, Д.Н. Лазарева //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2004. – Т.67, № 4. – С. 77 – 80.
179. Самотин, А.М. Гепатотропные препараты и их применение крупному рогатому скоту: автореф. дис. ... докт. вет. наук: 16.00.01, 03.00.04 / Самотин Анатолий Митрофанович. - Воронеж, 2002. - 48 с.
180. Самотруева М.А. Фармакологическая активность производных пиримидинов/М.А. Самотруева [и др.]//Астраханский медицинский журнал. - 2015. -№ 1. -С. 12-29.
181. Сибиряк, С.В. Цитохром P450 и иммунная система: факты, гипотезы, перспективы/ С.В. Сибиряк, В.А. Вахитов, Г.Ш. Курчатова - Уфа: Гилем. -2003. - 211 С.
182. Сидоров, И.В Роль биооксидантов в обменных процессах в организме животных / И. В. Сидоров., Н.А. Костромитинов, Е.М. Уколова // Ветеринария. – 2003. -№12. – С.42-45.

183. Скакун, Н.П. Сравнительная эффективность растительных флавоноидных препаратов при остром поражении печени / Н.П. Скакун, И.П. Мосейчас // Фармакол. и токсикология. - 1991. - № 26. - С.120-123.

184. Слободяник, В. С. Морфология печени поросят при гепатодистрофии, ее профилактике и терапии препаратами пантотеновой кислоты и карнитина: автореферат дис. ... доктора биологических наук : 16.00.02 // В. С. Слободяник / Башкир. гос. аграр. ун-т - Уфа, 2007 - 34 с.,

185. Смоленцев, С.Ю. Профилактика токсической дистрофии печени поросят применением сукцината железа в сочетании с витаминами А и Е: автореф. дисс. ... канд. вет. наук/ С.Ю. Смоленцев - Казань, 2007. - 22 с.

186. Смольякова, В.И. Гепатопротекторные эффекты тиофана при экспериментальном поражении печени тетрахлорметаном / В.И. Смольякова [и др.]// Эксперим. и клинич. фармакология. – 2011. – Т. 74. - № 8. – С. 37–40.

187. Собчак, Д.М. Оценка показателей реактивности иммунной системы у больных хроническим гепатитом С / Д.М. Собчак, О.В. Корочкина // Терапевт. арх. – 2008. – Т. 80, № 2. – С. 61–66.

188. Сомова, М.Н. Лекарственно-индуцированные поражения печени и вопросы их фармакологической коррекции / М.Н. Сомова [и др.]// Эксперим. и клинич. фармакология. – 2013. – Т. 76, № 9. – С. 38–43.

189. Стальная, И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М., 1977. – С. 66–68.

190. Сухарева, Г.В. Поражения печени у больных с гепатоцеребральной дистрофией / Г.В. Сухарева [и др.]// Терапевт. арх. – 2006. – Т. 78, № 2. – С. 52–57.

191. Тананова, О.Н. Влияние наночастиц диоксида титана на белковый профиль микросом печени крыс / О.Н. Тананова [и др.]// Вопросы питания. – 2012. – Т. 81, № 2. – С. 18–22.

192. Терещенко, Ю.А. Диагностический поиск при длительном малосимптомном повышении активности аминотрансфераз / Ю.А. Терещенко, С.Ю. Терещенко // Гастроэнтерология. – 2013. - № 2. – С. 32-37.

193. Ткаченко, Т.Е. Показатели крови и мочи при нарушениях обмена веществ у коров / Т.Е. Ткаченко // Ветеринария. - 2003. - №10. - С.43-47.
194. Токаев, Э.С. Биологически активные вещества / Э.С. Токаев, Н.П. Блохина, Е.А. Некрасов // Вопросы питания. – 2007. – Т. 76, № 4. – С. 4–9.
195. Удут, В.В. Влияние гепатопротекторов фосфолипидной природы на процессы апоптоза при экспериментальной патологии печени, вызванной изониазидом и парацетомолом / В.В. Удут, А.И. Венгеровский, А.М. Дыгай // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2012. – Т. 154, № 11. – С. 568–571.
196. Уша, Б.В. Разработка методов и средств для лечения печеночной недостаточности у животных / Б.В. Уша, А.А. Концевова, А.М. Смирнов, В.В. Светличкин // «Веткорм». – 2011. - №5. – С. 25-26.
197. Фердман, Н.А. Эффективность селеносодержащих препаратов при гепатозе коров: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01 / Фердман Наталья Анатольевна. – Екатеринбург, 2007. – 18 с.
198. ФЗ № 12 5 «Об архивном деле в Российской Федерации» от 22.10.2004 с изменениями на 13 мая 2008 г.
199. Хазимухаметова, И.Ф. Гепатозы крупного рогатого скота (этиология, патогенез, диагностика и лечение) : автореф. дис. ... докт. вет. наук: 16.00.01 / Хазимухаметова Идалья Фуатовна. - Казань, 2001. - 44 с.
200. Хазимухаметова, И.Ф. Диагностика и коррекция обмена веществ у коров при патологии печени / И.Ф. Хазимухаметова, Э.М. Баширова // Научные труды УГАВМ. - Троицк. – 2009. – С. 97-100.
201. Хазимухаметова, И.Ф. Динамика активности аминотрансфераз у коров при гепатозе/ И.Ф. Хазимухаметова, Э.М. Баширова // М-лы междунар. науч.-практич. конф. – Ижевск. - 2010. – С. 211-213.
202. Хазимухаметова, И.Ф. Лечение коров при гепатозе / И.Ф. Хазимухаметова, Р.Р. Идрисова // Ветеринария. - 2008. - №5. - С. 39-42.
203. Характеристика состава лекарственных препаратов и семян растопши пятнистой (*Silybum marianum*) / А.С. Щекатихина [и др.] // Труды БГУ.

Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2006. – Вып. I. – С.280–290.

204. Цыганенко, А.Я. Клиническая биохимия / А.Я. Цыганенко, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, И.В. Завгородний. -М.: Триада-Х, 2002. - 504 с.

205. Чернов, В.Н. Влияние оксиметилурацила на перекисное окисление липидов и функционально-метаболические показатели печени при интоксикации старых крыс тетрахлорметаном / В.Н. Чернов [и др.] // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – № 4. – С. 29–30.

206. Шибитов, В.А. Восстановление детоксикационной способности организма при эндотоксикозе под воздействием антиоксидантной терапии / В.А. Шибитов, С.Г. Анаксян // Клинич. фармакология и терапия. – 2013. – № 1. – С. 51– 54.

207. Шилова, И.В. Гепатозащитные свойства фракций экстракта лабазника вязолистного при экспериментальном токсическом гепатите / И.В. Шилова [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008 б. – Т. 146, № 7. – С. 54–57.

208. Шифф, Ю.Р. Введение в гепатологию: руководство / Ю.Р. Шифф, М.Ф. Соррел, У.С. Мэддрей / под ред. В.Т. Ивашкина, А.О. Буеверова, М.В. Маевской. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2011. – 704 с.

209. Шперлинг, И.А. Модификация структуры мембраны эритроцитов при токсическом действии гематотропных ксенобиотиков / И.А. Шперлинг [и др.]// Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. – 2008. – № 1. – С. 14–18.

210. Шулутко, Б.И. Болезни печени и почек / Б.И. Шулутко. – Изд. 2-е испр. и дополн. – СПб.: изд-во РЕНКОР, 1995. – 480 с.

211. Шульгин, К. К. Регуляция активности глутатионпероксидазы при токсическом поражении печени крыс и действии веществ - протекторов: Дис. ... канд. биол. наук. Воронеж, 2008. - 173 с

212. Шульгин, К.К. Каталитические свойства глутатионпероксидазы в норме и при токсическом гепатите / К.К. Шульгин [и др.] // Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. – 2008. – № 3. – С. 38–41.

213. Щербаков Д.Л. Влияние нейромедиаторов на перекисное окисление липидов и антиокислительную активность при иммобилизационном стресс-воздействии у крыс разного возраста: Дис ... канд. биол. наук: 03.03.01. – Екатеринбург, 2015. – 168 с.
214. Юшков, Б.Г. Влияние иммуномодуляторов на регенерацию печени / Б.Г. Юшков, И.Г. Данилова, Ю.С. Храмцова // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2006. – Т. 69, № 1. – С. 53–55.
215. Яцковский А.Н. Действие мази с метилурацилом 3 % на заживление ожоговых ран/ А.Н. Яцковский [и др.] // Сб. науч. Трудов ММА им. И.М. Сеченова (к 100-летию со дня рожд. засл. деятеля науки РСФСР, проф. В.Г. Елисеева). – М., 1999 – С. 219–220.
216. Яцковский А.Н. Количественные параметры реактивных изменений гепатоцитов крыс при длительном воздействии 6-метиурацила/ А.Н. Яцковский, Т.А. Белоусова, С.А. Жучков // Морфология. – 2000 – Т.117, № 3 – С. 145
217. Agatonovic-Kustrin S. Strategy for the development of a thermodynamically stable oral microemulsion/ S. Agatonovic-Kustrin, B.D. Glass, M.H. Wisch // Curr. Drug Discov. Technol. - 2004. - V. 1. - P. 165-171.
218. Agrawal S.S., Munjal P. Permeation studies of atenolol and metoprolol tartrate from three different polymer matrices for transdermal delivery/ S.S. Agrawal, P. Munjal // Indian J. Pharm. Sci. – 2007. - V.69, No4. - P.535-539.
219. Almgren M. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants/ M. Almgren // Biochim. Biophys. Acta. - 2000. - V. 1508. - P. 146-163.
220. Al-Rasheed N.M. Preventive effects of selenium yeast, chromium picolinate, zinc sulfate and their combination on oxidative stress, inflammation, impaired angiogenesis and atherogenesis in myocardial infarction in rats/ N.M. Al-Rasheed // J Pharm Pharm Sci. – 2013. – N. 16(5). – P. 848-867.
221. Anderson, P.H. The skeleton as an intracrine organ for vitamin D metabolism/ P.H. Anderson, G.J. Atkins //Mol Aspects Med. – 2008. – N. 29. – P. 397–406.

222. Apalkova.I. Prevalence and Diagnosis of Liver Diseases in Small Animal University Hospital 2007-2010 - a Retrospective Study/I.Apalkova. - University of Helsinki.,2012. – 50 p.
223. Azam, N. Disordered regulation of renal 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase gene expression by phosphorus in X-linked hypophosphatemic (Hyp) mice/ N. Azam [et al.]//Endocrinology. – 2003. – N. 144. – P.3463–3468.
224. Bai, X-Y. The autosomal dominant hypophosphatemic rickets R176Q mutation in fibroblast growth factor 23 resists proteolytic cleavage and enhances in vivo biological potency/ X-Y. Bai [et al.]//J Biol Chem. – 2003. – N. 276. – P.9843–9849.
225. Ball, G.F.M. Vitamins in Foods: Analysis, bioavailability, and stability. Boca Raton/ G.F.M. Ball. - Florida: CRC Press. – 2006. - pp. 119–136.
226. Barry, B.W. Drug delivery routes in skin: a novel approach/B.W. Barry // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2002. - V.54. - No1. - P.31-40.
227. Barsony, J. Vitamin D receptor and retinoid receptor interactions in motion/J.Barsony, K. Prufer// Vitam Horm. – 2002. – N.65. – P.345–376.
228. Basu, S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients/S.Basu// Toxicology. – 2003. – N.189. – P.113-127.
229. Batrakova, E.V. Optimal structural requirements for Pluronic blok copolymers in modifying p-glicoprotein drug efflux activity in bovine brain endothelial cells/ E.V. Batrakova [et al.]// J. Pharmacol. Exp. Ther. - 2003. - V. 304. - P. 845-854.
230. Batrakova, E.V. Pluronic P85 enhances the delivery of digoxin to the brain: in vitro and in vivo studies/ E.V. Batrakova [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Ther. - 2001. - V. 296. - P. 551-557.
231. Benstoem Carina. Selenium and Its Supplementation in Cardiovascular Disease—What do We Know?/C. Benstoem [et al.]//Nutrients. – 2015. – N. 7 (5). – P.3094-3118.
232. Berndt, T.J.“Phosphatonins” and the regulation of phosphorus homeostasis/ T.J. Berndt, S. Schiavi, R. Kumar// Am J Physiol Renal Physiol. – 2005. – N. 289. – P.F1170–F1182.

233. Bielesz, B. Renal phosphate loss in hereditary and acquired disorders of bone mineralization/ B. Bielesz, K. Klaushofer// *Bone*. – 2004. – N.35. – P.1229–1239.
234. Bikle, D. Nonclassic actions of vitamin D/D. Bikle// *J Clin Endocrinol Metab*. – 2009. – Vol. 94. – 26–34.
235. Bo Huang. Free radical scavenging efficiency of nano-Se in vitro/ Bo Huang [et al.]// *Free Radical Biology & Medicine*.-2003.-Vol.-35.-No. 7.-pp.805–813
236. Booth, S.L. Effect of vitamin E supplementation on vitamin K status in adults with normal coagulation status/ S.L. Booth [et al.] // *Am J Clin Nutr*. – 2004. – N.80. – P.143–148.
237. Boros, S. Ca^{2p} reabsorption in the connecting tubule/S. Boros, R. Bindels, J. Hoenderop// *Pflugers Arch*. – 2009. – N.458. – P.99–109.
238. Bosisio, E. Effect of the flavanolignans of *Silybum marianum* L. on lipid peroxidation in rat liver microsomes and freshly isolated hepatocytes/ E. Bosisio [et al.]// *Pharmacol Res*. – 1992. – N.25. – P.147-154.
239. Bouillon, R. Intestinal calcium absorption: molecular vitamin D mediated mechanisms/ R. Bouillon, Van S. Cromphaut, G. Carmeliet// *J Cell Biochem*. – 2003. – N. 88. – P.332–339.
240. Boyce, B.F. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling/ B.F. Boyce, L. Xing// *Arch Biochem Biophys*. – 2008. – N.473. – P.139–146.
241. Brenneisen, P. Selenium, oxidative stress, and health aspects/ P. Brenneisen, H. Steinbrenner, H. Sies // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2005.- V. 26. – P. 256–267
242. Brinkman, M. Are men with low selenium levels at increased risk of prostate cancer?/ M. Brinkman [et al.]// *European Journal of Cancer*. - 2006. – №15. - P. 2463-2471.
243. Brock, K. Associations with vitamin D deficiency in «at risk»/K.Brock [et al.]// *J Steroid Biochem Mol Biol*. – 2004. – N.89–90. – P.581–588.

244. Bula, C.M. Presence of a truncated form of the vitamin D receptor (VDR) in a strain of VDR-knockout mice/ C.M. Bula [et al.]//Endocrinology. – 2005. – N.146. – P. 5581–5586.
245. Burger K.N.J. Nanocapsules: lipid-coated aggregates of cisplatin with high cytotoxicity/ K.N.J. Burger [et al.] // Nat. Med. - 2002. - V. 8. - P. 81-84.
246. Burger RM, William HG, Gary WF. Evaluation of UVB reduction by materials commonly used in reptile husbandry/ R.M. Burger, H.G. William, W.F. Gary//Zoo Biol. – 2007. – N. 26. – P. 417–423.
247. Campbell R.B. Phospholipid-cationic lipid interactions: influences on membrane and vesicle properties/ R.B. Campbell, S.V. Balasubramanian, R.M. Straubinger // BBA-Biomembranes. - 2001. - V. 1512. - P. 27-39.
248. Campos R, Garido A, Guerra R, et al. Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver/ R. Campos [et al.]//Planta Med. – 1989. – N. 55. – P. 417-419.
249. Carrion, C. Preparation of long-circulating immunoliposomes using PEG-cholesterol conjugates: effect of the spacer arm between PEG and cholesterol on liposomal characteristics/C. Carrion, J.C. Domingo, M.A. de Madariaga // Chem. Phys. Lipids. - 2001. - V. 113. - P. 97-110.
250. Casiraghi, A. The Influence of the Polar Head and the Hydrophobic Chain on the Skin Penetration Enhancement Effect of Poly (Ethylene Glycol) Derivatives/ A. Casiraghi [et al.] // AAPS Pharm. Sci.Tech. – 2012. - V.13. – No.1. - P.247-253.
251. Catherine, M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains/ M. Catherine [et al.]// Bioconjugate Chem.-2004. - №15. - P.897-900
252. Christian, M. Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products/M. Christian [et al.] // J. Contr. Rel. - 2002. - V. 85. - P. 1-15.
253. Colombo ML. An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol: Perspectives/M.L. Colombo //Molecules. – 2010. – N.15. – P.2103–2113.

254. Croubels, S. Practical approach for the stability testing of veterinary drugs in solutions and in biological matrices during storage/S. Croubels, S. de Baere, P. de Backer // *Anal. Chim. Acta.* - 2003. - Vol. 483. - P. 419-427.
255. Cui W, Gu F and Hu KQ. Effects and mechanisms of silibinin on human hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice/ W. Cui, F. Gu, K.Q. Hu// *World J Gastroenterol.* – 2009. – N. 15. – P. 1943-1950.
256. Dehmlow C. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin/ C. Dehmlow, J. Erhard, H. de Groot // *Hepatology.*- 1996. – N. 23. – P. 749-754.
257. Desai, M.P. Immune response with biodegradable nanospheres and alum: studies in rabbits using staphylococcal enterotoxin B-toxoid/ M.P. Desai [et al.] // *J. Microencapsulation.* - 2000. - V. 17. - P. 215-225.
258. Devika, Chithrani B. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells/ Chithrani B. Devika [et al.] // *Nano Letters.* - 2006. - Vol.6. - No.4. - p.662-668
259. Dhingra, S. Attenuation of LDL receptor gene expression by selenium deficiency during hypercholesterolemia/S. Dhingra, M.P. Bansal// *Molecular and Cellular Biochemistry.* – 2006. – V. 282. – P.75–82.
260. Di Mascio P. Antioxidant defense systems: The role of carotenoids, tocopherols, and thiols/ P. Mascio Di, M.E. Murphy, H. Sies// *Am J Clin Nutr.* – 1991. – N. 53. – P. 194S–200S.
261. Drotleff A.M. Determination of RS,E/Z-tocotrienols by HPLC/ A.M. Drotleff, W. Ternes // *J Chromatogr A.* – 2001. – N.909. P. 215–23.
262. Drutel, A. Selenium and the thyroid gland: more good news for clinicians/ A.Drutel, F.Archambeaud, P. Caron// *Clinical Endocrinology (Oxf).* – 2013. – N.78(2). – P. 155-164.
263. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics/R. Duncan // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2003. - V. 2. - P. 347-360.
264. Dykman, L.A. Gold nanoparticles as an antigen carrier and an adjuvant/L.A. Dykman. -New York: Nova Science Publishers, – 2010. - 54 p.

265. Dykman, L.A. Uptake of engineered gold nanoparticles into mammalian cells/L.A. Dykman, N.G. Khlebtsov// Chem. Rev. – 2014. – N. 114. – P. 1258–1288.
266. European Convention for Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, – 1986.
267. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes: Strasbourg, 18.III.1986. Text amended according to the provisions of the Protocol (ETS No. 170) as of its entry into force on 2 December. – 2005.
268. Finney D.J. Probit analysis/ D.J. Finney //Cambridge: Cambridge University Press. - 1971. - P. 338.
269. Finney D.J. Statistical method in biological assay/ D.J. Finney //London: Griffin. - 1982. - 3d ed. - P. 58
270. Finney, D.J. Probit analysis/ D.J. Finney. - Cambridge: Cambridge University Press. – 1971. – 338 p.
271. Finney, D.J. Statistical method in biological assay/ Finney D.J. - London: Griffin. – 1982. - 3d ed. – 668 p.
272. Fleming, J., Ghose, A., Harrison, P.R. Molecular mechanisms of cancer prevention by selenium compounds/ J. Fleming, A. Ghose, P.R. Harrison// Nutrition and Cancer. – 2001. – V.40, №1.- P.42-49.
273. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine . Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: National Academy Press. – 2000.
274. Fubini, B. Microcalorimetric study of microemulsions as potential drug delivery systems. II. Evaluation of enthalpy in the presence of drugs/B. Fubini, M.R. Grasco, M. Gallarate // Int. J. Pharm. - 1989. - V. 50. - P. 213-217.
275. Furman, C.Thioredoxin reductase 1 is upregulated in atherosclerotic plaques: specific induction of the promoter in human macrophages by oxidized low-density lipoproteins/ C. Furman[et al.]// Free Radical Biology and Medicine. - 2004. – V. 37. - P. 71-85.

276. Gagne J.-F. Targeted delivery of indinavir to HIV-1 primary reservoirs with immunoliposomes/J.-F. Gagne [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2002. - V. 1558. - P. 198-210.
277. Gaucher G., Dufresne M.-H., Sant V.P., Kang N., Maysinger D., Leroux J.-C. Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery/G. Gaucher [et al.] // *J. Contr. Rel.* - 2005. - V. 109. - P. 169-188.
278. Gazarík R, Walterova D, and Kren V (2007) Silybin and silymarin—new and emerging applications in medicine/R. Gazarík, D. Walterova, V. Kren// *Curr Med Chem.* - 2007 - – N. 14. P. 315–338.
279. Geisen, V. Vitamin D–dependent hereditary rickets type in a cat/ V. Geisen, K. Weber, K. Hartmann// *J Vet Intern Med.* – 2009. – N. 23. – P. 196–199.
280. Geissler, R.G. In vitro improvement of bone marrow-derived hematopoietic colony formation in HIV-positive patients by alpha-D-tocopherol and erythropoietin/R.G. Geissler [et al.]// *Eur J Haematol.* – 1994. – N. 53. – P. 201–206.
281. Glynn R.J. Effects of random allocation to vitamin E supplementation on the occurrence of venous thromboembolism/R.J. Glynn [et al.] // *Report from the Women’s Health Study. Circulation.* – 2007. – N. 116. – P. 1497–503.
282. Godfrey, D.R. Vitamin D– dependent rickets type II in a cat/ D.R. Godfrey [et al.]// *J Small Anim Pract.* – 2005. – N.46. – P. 440–444.
283. Goltzman, D. Effects of calcium and of the Vitamin D system on skeletal and calcium homeostasis: lessons from genetic models/ D. Goltzman [et al.]// *J Steroid Biochem Mol Biol.* – 2004. – N. 89–90. – P. 485–489.
284. Graham, S.M. Higher pre-infection vitamin E levels are associated with higher mortality in HIV-1-infected Kenyan women: A prospective study/ S.M. Graham [et al.]// *BMC Infect Dis.* – 2007. – N.7. – P. 63.
285. Gutierrez I. Immune responses to orally administered PLGA microparticles: influence of oil vehicles and surfactive agents/I. Gutierrez [et al.] // *J. Microencapsulation.* - 2003. - V. 20. - P. 525-536.

286. Hahn, V. G. Pharmacology and toxicology of silymarin, the anti-hepatotoxic agent of *Silybum marianum* (L.) Gaertn/V.G. Hahn [et al.]// *Arzneim. Forsch.* – 1968. – N. 18. – P. 698–704.
287. Halim A.B. Biochemical effect of antioxidants on lipids and liver function in experimentally-induced liver damage/ A.B. Halim [et al.]// *Ann Clin Biochem.* – 1997. – N. 34. – P. 656-663.
288. Han Gang. Functionalized gold nanoparticles for drug delivery/ Han Gang, Ghosh Partha, Vincent M. Rotello // *Nanomedicine.*-2007.-V.2.-№1.- P.113-123
289. Hannam, S. Severe vitamin D deficient rickets in black Afro-Caribbean children/ S. Hannam, S. Lee, M. Sellars//*Arch Dis Child.* – 2004. – N. 89. – P.91–92.
290. Haskett, E.S. Milk Thistle and Its Derivative Compounds: A Review of Opportunities for Treatment of Liver Disease/ E.S. Haskett, D.C. Twedt, D.L. Gustafson//*Journal of veterinary internal medicine.* – 2013. – T. 27.- N.1. – P.10-16.
291. Hatun, S. Vitamin D deficiency in early infancy/ S. Hatun [et al.]// *J Nutr.* – 2005. – N. 135. – P. 279–282.
292. Hill, K.E. Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse/ K.E. Hill et al.// *Journal of Biological Chemistry.* - 2003 . – N. 18. Vol. 278(16). – P. 13640-13646.
293. Hodgson J. ADMET – turning chemicals into drugs / J. Hodgson// *Nat. Biotech.* - 2001. - V. 19. - P. 722-726.
294. Hoffman, P.R. The influence of selenium on immune responses/ P.R. Hoffman, M.J. Berry// *Molecular nutrition and food research.* – 2008. – N. 52(11). – P. 1273 – 1280.
295. Howard A.C. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E/ A.C. Howard [et al.] *Nat Commun.* – 2011. – N. 20. – P. 597.
296. Iden, D.L. In vitro and in vivo comparison of immunoliposomes made by conventional coupling techniques with those made by a new post-insertion approach/ D.L. Iden, T.M. Allen // *Biochim. Biohyps. Acta.* - 2001. - V. 1513. - P. 207-216.
297. Jacques, P.F. Long-term nutrient intake and 5-year change in nuclear lens opacities/ P.F. Jacques [et al.]//*Arch Ophthalmol.* – 2005. – N. 123. – P. 517–26.

298. Jiang, Q. Gamma-tocopherol or combinations of vitamin E forms induce cell death in human prostate cancer cells by interrupting sphingolipid synthesis/ Q. Jiang [et al.]//Proc Natl Acad Sci U S A. – 2004. – N. 101. - P. 17825–17830.
299. Jiunn, L.H. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development/L.H. Jiunn, L.H.Y. Anthony // Pharm. Rev. - 1997. - V.49. - P. 403-449.
300. Kabanov, A.V. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery/A.V. Kabanov [et al.] // J. Contr. Rel. - 2002. - V. 82. - P. 189-212.
301. Kauntz, H. Silibinin triggers apoptotic signaling pathways and autophagic survival response in human colon adenocarcinoma cells and their derived meta- static cells/H. Kauntz [et al.] // Apoptosis. – 2011. – N. 16. – P. 1042-1053.
302. Khan, M. S. Gold nanoparticles: a paradigm shift in biomedical applications/M.S. Khan, G.D. Vishakante, H. Siddaramaiah // Adv Colloid Interface Sci. – 2013. – N. 44-58. – P. 199-200.
303. Khlebtsov, N. Analytical and theranostic applications of gold nanoparticles and multifunctional nanocomposites/N. Khlebtsov [et al.]// Theranostics. – 2013. – N. 3(3). – P. 167-80.
304. Klein, E.A. The Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial: rationale and design/ E.A Klein [et al.]// Prostate Cancer and Prostatic Diseases, -2000. - V.3. - P.145-151
305. Klotz, L.-O. Role of Copper, Zinc, Selenium and Tellurium in the Cellular Defense against Oxidative and Nitrosative Stress/ Lars-Oliver Klotz [et al.] // Journal of Nutrition. – 2003. - V. 133, No 5. – P. 1448S-1451
306. Kono, N. Impaired a-TTP-PIPs interaction underlies familial vitamin E deficiency/N. Kono [et al.]// Science. – 2013. – N. 340. – P. 1106–1110.
307. Kropotov, A.V. Antiper- oxidant effects of trepang extract Stichopus japonicas/A.V. Kropotov [et al.] // Pacific medical journal. - 2004. - N. 3. - P. 18–20.

308. Kwon G.S. Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds/ G.S. Kwon// *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. – 2003. – V.20. - №5. – P. 357 – 403.
309. Lah, J.J. Effects and mechanisms of silibinin on human hepatoma cell lines/J.J. Lah, W. Cui, K.Q. Hu// *World J Gastroenterol*. – 2007. – N. 13. – P. 5299-5305.
310. Lambert, G. Polyalkylanoacrylate nanospheres and nanocapsules for the delivery of antisense oligonucleotides/G. Lambert // *J. Disp. Sci. Technol*. - 2003. - V. 24. - P. 439-452.
311. Lavasanifar, A. Poly(ethylene oxide)-block –poly(L-amino acid) micelles for drug delivery/A. Lavasanifar, J. Samuel, G.S. Kwon // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* - 2002. - V. 54. - P. 169-190.
312. Lee, I.M. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: The Women’s Health Study: A randomized controlled trial/I.M. Lee [et al.]// *JAMA*. – 2005. – N. 294. - P.56–65.
313. Letteron, P., Labbe, G., Degott, C., Berson, A., Fromenty, B., Delaforge, M., Larrey, D., and Pessayre, D. Mechanism for the protective effects of silymarin against carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation and hepatotoxicity in mice. *Biochem. Phar- macol*. – 1990. – N.39. – P. 2027–2034.
314. Lim R. A method for the evaluation of cumulation and tolerance by the determination of acute and subchronic median effective doses/ R.K. Lim [et al.] // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther*. – 1961. – Vol. 130. - Mar 1. – P. 336 -353.
315. Lim S.T. Preparation and evaluation of the in vitro drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan/ R.K. Lim [et al.]// *J. Contr. Rel*. - 2000. - V. 66. - P. 281-292.
316. Lin H. Jiunn. Anthony Role of Pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development/H. Jiunn Lin, H.Y. Lu// *Pharmacological Reviews*. - 1997.- V.49.-№4.-P.403-449.

317. Lindh, U. Selenium protection against toxicity from cadmium and mercury studied at the cellular level/ U.Lindh, A. Danersund , A. Lindvall// Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). – 1996. – N. 42 (1). P. 39-48.
318. Lippman, S.M. Designing the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT) /S.M. Lippman [et al.]. // JNCI J Natl Cancer Inst, - 2005. - V. 97, №2, - P. 94-102.
319. Liu M, Wallmon A, Olsson-Mortlock C, Wallin R, Saldeen T. Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: Potential mechanisms/M. Liu [et al.]// Am J Clin Nutr. – 2003. – N. 77. – P. 700–706.
320. Liu Yang. Aptamer-conjugated nanomaterials and their applications/ Y. Liu [et al.]// Adv Drug Deliv Rev. – 2011. – N. 63(14-15). – P. 1361–1370.
321. Liu, M. Mixed tocopherols have a stronger inhibitory effect on lipid peroxidation than alpha-tocopherol alone/M. Liu [et al.]// J Cardiovasc Pharmacol. – 2002. – N. 39. – P. 714–21.
322. Liu, M.Y. Anti-hepatotoxic effects of 3,4-methylenedioxyphenol and N-acetylcysteine in acutely acetaminophen-overdosed mice/Liu M. Y. [et al.] // Human and Experimental Toxicology. - 2010(2011). – V. 30(10). – P. 1609–1615
323. Lonn, E. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: A randomized controlled trial/E. Lonn [et al.]// JAMA. – 2005. – N. 293. – P. 1338–47.
324. Luo, Y. Plasmid DNA encoding human carcinoembryonic antigen (CEA) adsorbed onto cationic microparticles induces protective immunity against colon cancer in CEA-transgenic mice/ Y. Luo [et al.] // Vaccine. - 2003. - V. 21. - P. 1938-1947.
325. Majewska, M. Flavonoids in prevention and therapy diseases/ M. Majewska, H. Czeczot//Ter Lek. – 2009. – N. 65(5). – P. 369-377
326. Małolepsza, U. Plant flavonoids as biochemical active compounds/ U. Małolepsza, H. Urbanek// Wiad Bot. – 2000. – N. 44(3/4). – P. 27-37
327. Manach, C. Polyphenols: food sources and bioavailability/ C. Manach [et al.]//Am J Clin Nutr. – 2004. – Vol. 79 – P. 727-747.

328. Mangialasche, F. Classification and prediction of clinical diagnosis of Alzheimer's disease based on MRI and plasma measures of α - γ -tocotrienols and γ -tocopherol/ F. Mangialasche [et al.]// J Intern Med. – 2013. – N. 273. – P. 602–21.
329. Mangialasche, F. High plasma levels of vitamin E forms and reduced Alzheimer's disease risk in advanced age/ F. Mangialasche [et al.]// J Alzheimer's Dis. – 2010. – N. 20. – P. 1029–1037.
330. McAnally, J.A. Tocotrienols potentiate lovastatin-mediated growth suppression in vitro and in vivo/ J.A. McAnally //Exp Biol Med (Maywood). – 2007. – N. 232. – P. 523–531.
331. Mehdi Y. Selenium in Cattle: A Review/ Y. Mehdi, I. Dufrasne// Molecules. Mehdi Y. Selenium in Cattle. Mehdi Y. Selenium in Cattle. – 2016- №21 (4). – P. 545.
332. Moghimi, S.M. Long circulating and target – specific nanoparticles: theory to practice/ S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray // Pharmacol. Rev. - 2001. - V. 53. - P. 283-318.
333. Morazzoni, P. Silybum marianum (Carduus marianus)/ P. Morazzoni, E. Bombardelli// Fitoterapia. – 1996. – N. 66. – P. 3– 42.
334. Morris, K.R. approaches to physical transformation of active pharmaceutical ingredients during manufacturing processes / K.R. Morris [et al.] // Adv. Drug Deliv. Rev. - 2001. - V. 48. - P. 91-114.
335. Mourelle, M. Prevention of CCl₄-induced liver cirrhosis by silymarin/ M.Mourelle [et al.]//Fund. Clin. Pharmacol. – 1989. – N. 3. – P. 183–191.
336. Müller R.H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art/ R.H. Müller [et al.] // Eur. J. Pharm. Biopharm. - 2000. - V. 50. - P. 161-177.
337. Niki, E. A history of vitamin E/E. Niki, M.G. Traber //Ann Nutr Metab.- 2012. – N.61. – P. 207–12.
338. O'Hagan D. Induction of potent immune responses by cationic microparticles with adsorbed human immunodeficiency virus DNA vaccines/ D. O'Hagan [et al.] // J. Virol. - 2001. - V. 75. - P. 9037-9043.

339. Okada H. Biodegradable microspheres in drug delivery/H. Okada, H. Toguchi // *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.* - 1995. - V. 12. - P. 1-99.
340. Okazaki, S. Enhanced tumor accumulation and anticancer activity of cisplatin-loaded polymeric micelles/ S. Okazaki [et al.] // *J. Contr. Rel.* - 2003. - V. 91. - P. 233-236
341. Ollivon, M. Vesicle reconstitution from lipid-detergent mixed micelles/M. Ollivon [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2000. - V. 1508. - P. 34-50.
342. Paciotti G.F. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery/ G.F. Paciotti [et al.]//*Drug Deliv.* – 2004. – N. 11. – P. 169–183.
343. Paciotti, G.F. Colloidal gold nanoparticles: a novel nanoparticle platform for developing multifunctional tumor-targeted drug delivery vectors/ G.F. Paciotti [et al.]// *Drug Dev. Res.* – 2006. – N.67. – P. 47–54.
344. Pathan, I.B. Chemical Penetration Enhancers for Transdermal Drug Delivery Systems/ I.B. Pathan, C.M. Setty // *Tropical J. of Pharm. Research.* - 2009 - V.8, No2. - P.173-179.
345. Pavlik, V.N. Vitamin E use Is associated with improved survival in an Alzheimer's disease cohort/ V.N. Pavlik [et al.]//*Dement Geriatr Cogn Disord.* – 2009. – N.28. – P. 536–40.
346. Pollastri, S. Flavonols: old compounds for old roles/ S. Pollastri [et al.]//*Ann Bot.* – 2011. – N. 108. – P. 1225-1233.
347. Polyvalent Oligonucleotide Gold Nanoparticle Conjugates as Delivery Vehicles for Platinum(IV)/ Warheads Shanta Dhar [et al.]//*J. AM. CHEM. SOC.* – 2009. – N. 131. – P.14652–1465.
348. Putney, S.D. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations/ S.D. Putney, P.A. Burke // *Nat. Biotechnol.* - 1998. - V. 16. - P. 153-157.
349. Rajesh Singh. Nanoparticle-based targeted drug delivery/ S. Rajesh [et al.] // *Exp Mol Pathol.* – 2009. – N. 86(3). – P. 215–223.
350. Rangel-Yagui C.O. Micellar solubilization of drugs / C.O. Rangel-Yagui [et al.]// *J. Pharm. Pharm. Sci.* - 2005. - V. 8. - P. 147-163.

351. Ranson, M. Results of a cancer research campaign phase I dose escalation trial of SP1049C in patients with advanced cancer/ M. Ranson [et al.] // 5th Int. Symp. Polym. Ther. – 2002. - P. 15.
352. Rathore, G.S. Nutritional antioxidants: A battle for better health/ G.S. Rathore [et al.]// J Nat Pharmaceuticals. – 2011. – N. 2. – P. 2–14.
353. Rechnagel, R. O. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage CRC critical reviews in toxicology/R.O. Rechnagel. – 1973. – N. 2. –P. 263-297.
354. Reza Bavarsad Shahripour. N -acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities/ R. B. Shahripour , M. R. Harrigan ,A. V. Alexandrov// Brain and behavior. – 2014. – N. 4(2). – P. 108–122
355. Richelle, M. Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium/M. Richelle [et al.]//Br J Nutr. – 2006. – V.96. – P.227–238.
356. Rotruck, J.T Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase/ J.T. Rotruck et al.//Science. – 1973. – N 9. – P. 588 – 590.
357. Scholl, I. Allergen-loaded biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles down-regulate an ongoing Th2 response in the BALB/c mouse model/ I. Scholl [et al.] // Clin. Exp. Allergy. - 2004. - V. 34. - P. 315-321.
358. Schwarz K. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic/K. Schwarz, C.M Folz// Journal of the American Chemical Society. – 1957. – N 79. – P.3292.
359. Sesso, H.D. Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: The Physicians' Health Study II randomized controlled trial/ H.D. Sesso//JAMA. – 2008. – N. 300. – P. 2123–2133.
360. Shabanov, P.D. Effects of polyprenol Ropren in toxic affection of the rat's liver and brain: study of liver function, behavior and metabolism of monoamines in the brain/ P.D. Shabanov [et al.] // Reviews on clinical pharmacology and drug therapy. - 2010. - V. 8. - N. 3. - P. 7–30

361. Shah S. Transdermal drug delivery technology revisited: recent advances/ S. Shah// Latest Reviews. - 2008 - V.6. - No5. - P.11-12.
362. Shim, W.S. Novel injectable pH and temperature sensitive block copolymer hydrogel/ W.S. Shim [et al.]// Biomacromolecules. - 2005. - V. 6. - P. 2930-2934.
363. Shim, W.S. Novel pH sensitive block copolymer micelles for solvent free drug loading / W.S. Shim [et al.]// Macromol. Biosci. - 2006. - V. 6. - P. 179-286.
364. Shyam Sundar. Drug targeting to infectious diseases by nanoparticles surface functionalized with special biomolecules/S. Shyam // Curr Med Chem. – 2012. – N. 19. – P.3196–3202.
365. Singh, I. Effects of gamma-tocopherol supplementation on thrombotic risk factors/ I. Singh [et al.]//Asia Pac J Clin Nutr. – 2007. – N.16. – P.422–428.
366. Singh, M. Mucosal immunization with HIV-1 DNA on cationic microparticles gene prolongs gene expression and enhances local and systemic immunity/ M. Singh [et al.] // Vaccine. - 2002. - V. 20. - P. 594-602.
367. Stone, W.L. Tocopherols and the treatment of colon cancer/ W.L. Stone [et al.]//Ann N Y Acad Sci. – 2004. – N.1031. – P. 223–233.
368. Tasduq, S.A. Biochemical manifestations of anti-tuberculosis drugs induced hepatotoxicity and the effect of silymarin/ S.A. Tasduq [et al.]//Hepatol Res. – 2005. – N. 31. – P. 132–135.
369. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC / T. Bernas[et al.]. - Archives of Biochemistry and Biophysics. - 2000.- Vol. 380. No. 1 - P. 108–116.
370. Tinggi, U. Selenium: its role as antioxidant in human health/ U. Tinggi //Environ Health Prev Med. – 2008. - V. 13(2), - P. 102-108.
371. Torchilin V.P. How do polymers prolong circulation time of liposomes?/V.P. Torchilin // J. Liposome Res. - 1996. - V 6. - P. 99-116.
372. Torchilin V.P. Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulating?/ V.P. Torchilin [et al.]// Adv. Drug. Deliv. Rev. - 1995. - V. 16. - P. 141-155.

373. Torchillin V.P. Micelles from lipid derivatives of water-soluble polymers as delivery systems for poorly soluble drugs/ V.P. Torchillin, A.N. Lykhanov// *Advanced Drug Delivery Reviews*. - 2004. – V.56. - №9. – P. 1273 – 1289.
374. Van Zuylen L.Role of formulation vehicles in taxane pharmacology/ L. Van Zuylen [et al.]// *Inv. New. Drug*. - 2001. - V. 19. - P. 125-141.
375. Vengerovskiy, A.I. Preclinical study of hepatoprotective remedies/A.I. Vengerovskiy [et al.] // *Pharmacological committee statements*. – 1999. – No. 2. – P. 9–12.
376. Vinceti, M. Selenium for preventing cancer/ M. Vinceti [et al.]// *Cochrane Database Syst Rev*. – 2014. – N. 3.
377. Vogel, G. Studies on the pharmacodynamics, including site and mode of action, of silymarin: the antihepatotoxic principle from *Silybum marianum* (L) Gaertn/ G. Vogel [et al.]// *Arzneim. Forsch*. – 1975. – No 25. – P. 82–89.
378. Wada S. Chemoprevention of tocotrienols: The mechanism of antiproliferative effects/S. Wada// *Forum Nutr*. – 2009. – N. 61. – P. 204–16.
379. Wagner H. The chemistry and analysis of silymarin from *Silybum marianum* Gaertn/ H. Wagner [et al.]// *Arzneimittelforschung*. – 1974. – N.24. – P.466-471.
380. Wagner H. Chemistry of silymarin (silibinin), the active principle of the fruits of *Silybum marianum* L. Gaertn. (*Carduus marianus* L.)/ H. Wagner [et al.]// *Arzneimittelforschung*. – 1968. – N. 18. – P. 688– 696.
381. Weber, L. W. Hepatotoxicity and Mechanism of Action of Haloalkanes: Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model/ L.W. Weber [et al.]// *CRC critical reviews in toxicology*. – 2003. – N. 33. – P. 105-136.
382. Weiss, W. P. Selenium nutrition of dairy cows: Comparing responses to organic and inorganic selenium forms/ W.P. Weiss// *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries*. – 2003. - P. 333-343.
383. Wellington, K. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders/ K. Wellington [et al.]// *BioDrugs*. – 2001. – No 15. – P. 465–489.

384. Wells, S.R. Alpha-, gamma- and delta-tocopherols reduce inflammatory angiogenesis in human microvascular endothelial cells/ S.R. Wells [et al.]//J Nutr Biochem. – 2010. – No 21. – P. 589–97.

385. World, C.J. Thioredoxin in the cardiovascular system/ C.J. World [et al.]// Journal of Molecular Medicine. – 2006. – Vol. 84, №12. – P. 997-1003

386. Yen, H. J. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes/ H.J. Yen [et al.] // Small. – 2009. – No 5(13). – P. 1553-61.

387. Yu, M.W. Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection/M.W. Yu [et al.]// American Journal of Epidemiology. – 1999. – No 150(4). – P. 367-374.

388. Zhang, H. Endothelial-specific expression of mitochondrial thioredoxin improves endothelial cell function and reduces atherosclerotic lesions /Haifeng Zhang [et al.]// Am J Pathol. – 2007. - V. 170. - №3. - P. 1108–1120

389. Zingg, J.M. Molecular and cellular activities of vitamin E analogues/J.M. Zingg// Mini Rev Med Chem. – 2007. – N. 7. – P. 543–58.

390. Takahashi, S. Suppression of prostate cancer in a transgenic rat model via gamma-tocopherol activation of caspase signaling/ S. Takahashi [et al.]//Prostate. – 2009. – N. 69. – P.644–51.

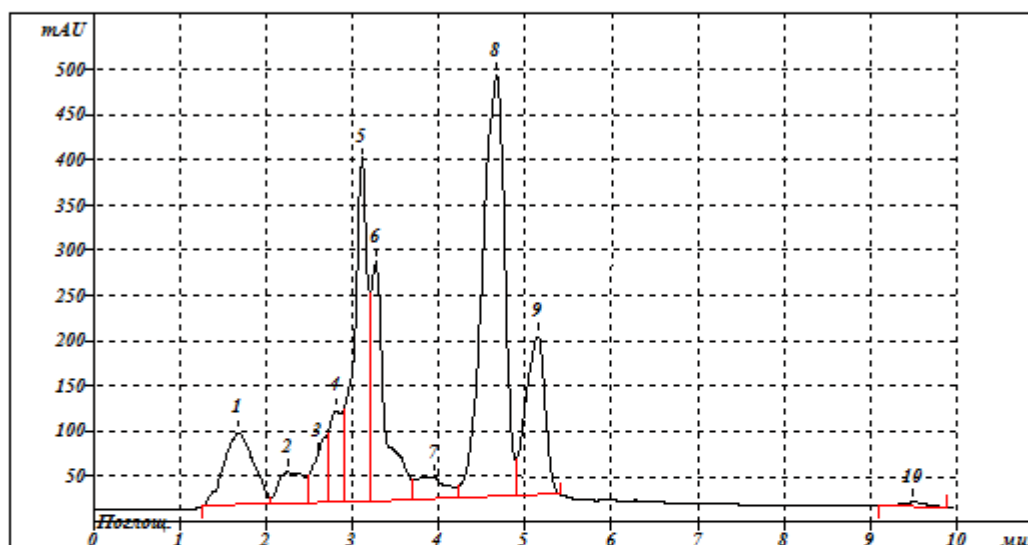
VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

ПРОБА: 1,5 мг/мл силимарин
 стандарт
 Пробирка №: 1
 Объем: 20.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00

КОЛОНКА: ЛUNA-18
 Размер: 2.0x60 мм

ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: АН 40%
 Скорость подачи: 0.90 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Нормировка отклика
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь мАУ*сек	Площадь %	Название
1	1.676	1912.79	8.20	
2	2.248	717.28	3.08	
3	2.592	720.69	3.09	
4	2.808	1088.96	4.67	
5	3.107	4062.47	17.42	
6	3.268	3061.31	13.13	
7	3.933	593.02	2.54	
8	4.671	8366.46	35.87	
9	5.146	2716.63	11.65	
10	9.491	83.46	0.36	
10	10	23323.06	100.00	

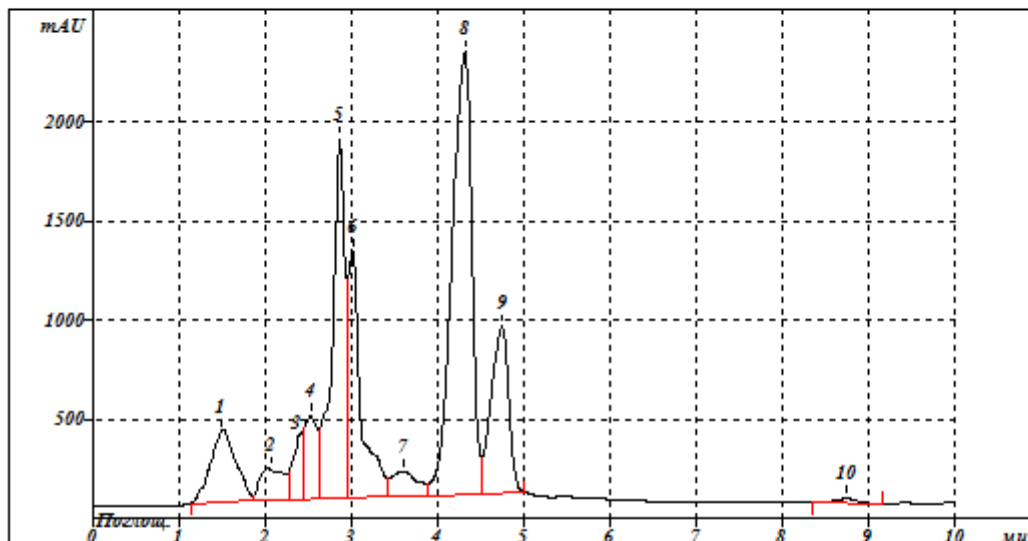
Отчет выдан программой МультИХром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсенд

Рисунок 46 - Хроматограмма стандартного образца силимарина с концентрацией 1,5 мг/мл.

ПРОБА: 6 мг/мл силимарин
 стандарт
 Пробирка №: 1
 Объем: 20.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00

КОЛОНКА: ЛUNA-18
 Размер: 2.0x60 мм

ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: АН 40%
 Скорость подачи: 0.90 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

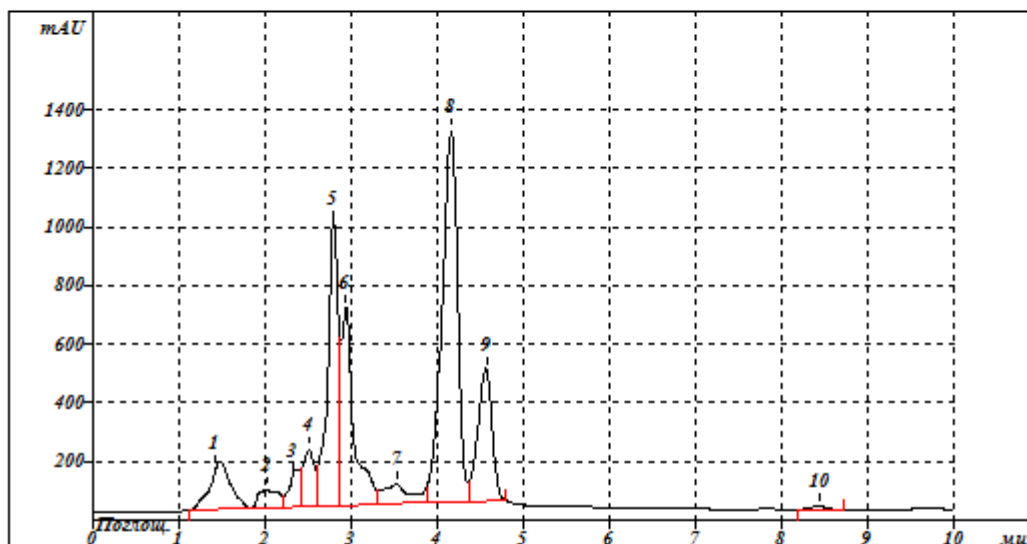
Метод расчета: Нормировка отклика
 Стандарт: Нет

No	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	1.503	7422.95	7.49	
2	2.058	3085.91	3.11	
3	2.359	2865.75	2.89	
4	2.525	3861.67	3.89	
5	2.859	17974.32	18.13	
6	3.017	13529.10	13.65	
7	3.591	2542.86	2.56	
8	4.309	35690.05	36.00	
9	4.742	11816.72	11.92	
10	8.745	360.61	0.36	
10	10.01	99149.94	100.00	

Отчет выдан программой Мультихром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсенд

Рисунок 47 - Хроматограмма стандартного образца силимарина с концентрацией 6 мг/мл.

ПРОБА: №1
 Пробирка №: 1
 Объем: 20.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00
 КОЛОНКА: ЛUNA-18
 Размер: 2.0x60 мм
 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: АН 40%
 Скорость подачи: 0.90 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

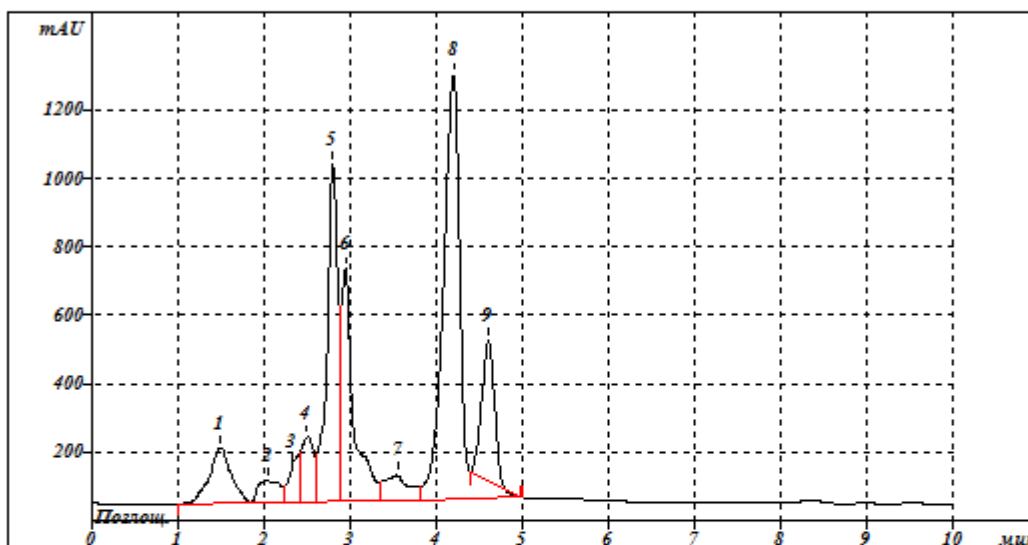
Метод расчета: Нормировка отклика
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь мAU*сек	Площадь %	Название
1	1.425	2708.96	6.08	
2	2.012	1033.82	2.32	
3	2.317	1110.09	2.49	
4	2.509	1808.81	4.06	
5	2.784	8089.47	18.15	
6	2.938	7049.17	15.82	
7	3.52	1509.76	3.39	
8	4.16	15887.37	35.65	
9	4.554	5209.77	11.69	
10	8.431	157.01	0.35	
10	10.01	44564.24	100.00	

Отчет выдан программой МультИХром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсенд

Рисунок 48 - Хроматограмма препарата силимарина на основе полимерных матриц

ПРОБА: №2
 Пробирка №: 1
 Объем: 20.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00
 КОЛОНКА: ЛUNA-18
 Размер: 2.0x60 мм
 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: АН 40%
 Скорость подачи: 0.90 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

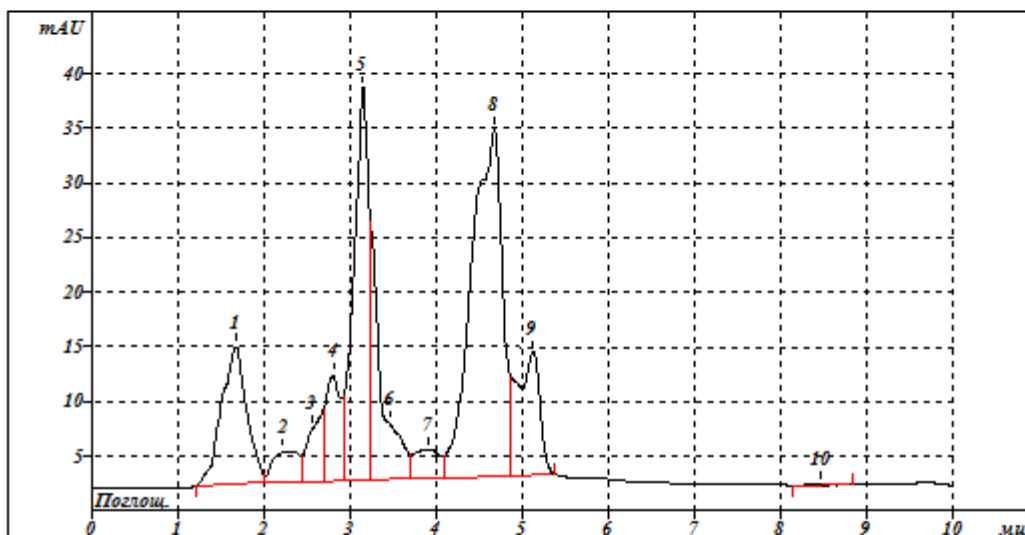
Метод расчета: Нормировка отклика
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	1.483	2928.51	6.38	
2	2.032	1165.39	2.54	
3	2.325	1072.14	2.34	
4	2.492	1902.39	4.15	
5	2.797	8623.86	18.80	
6	2.945	6781.21	14.78	
7	3.532	1483.51	3.23	
8	4.197	17611.77	38.38	
9	4.606	4314.27	9.40	
9	10.01	45883.04	100.00	

Отчет выдан программой МультИХром
 © 1993-2008 ЗАО Амперсэнд

Рисунок 49 - Хроматограмма препарата силимарина на основе наночастиц селена

ПРОБА: 0,15 мг/мл
 Пробирка №: 1
 Объем: 20.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00
 КОЛОНКА: Луна-18
 Размер: 2.0x60 мм
 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: АН 40%
 Скорость подачи: 0.90 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Нормировка отклика
 Стандарт: силимарин

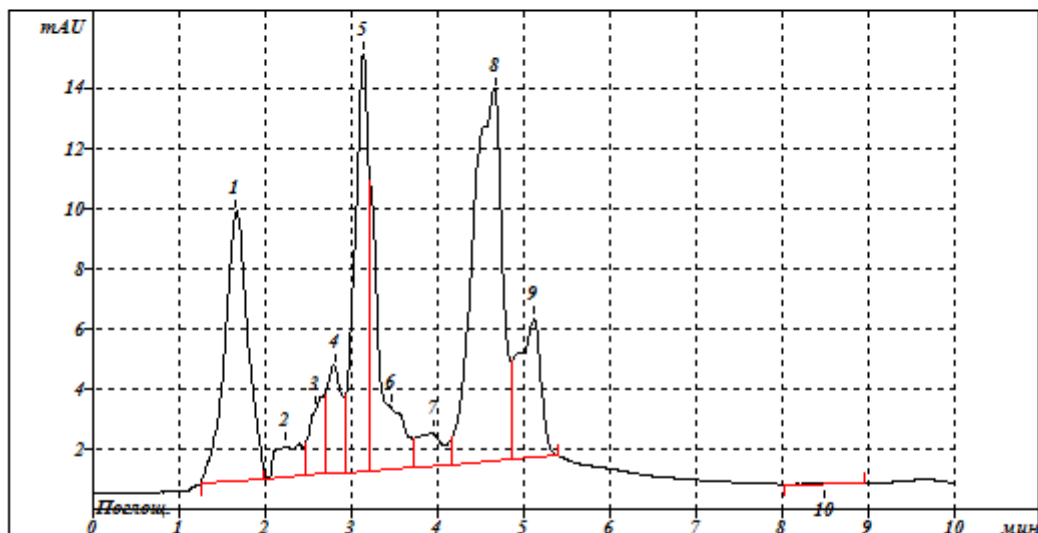
№	Время мин	Площадь мAU*сек	Площадь %	Название
1	1.672	256.23	11.79	
2	2.218	59.84	2.75	
3	2.56	69.01	3.17	
4	2.793	115.84	5.33	
5	3.145	416.67	19.17	
6	3.423	211.67	9.74	
7	3.898	55.68	2.56	
8	4.673	786.74	36.19	
9	5.104	201.89	9.29	
10	8.448	-0.08	-0.00	
10	10.01	2173.64	100.00	

ГРАДУИРОВКА И ФОРМУЛЫ

ОБЩИЕ ПАРАМЕТРЫ ГРАДУИРОВКИ

Рисунок 50 - Хроматограмма стандартного образца силимарина с концентрацией 0,15 мг/мл.

ПРОБА: 0,05 мг/мл
 Пробирка №: 1
 Объем: 20.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00
 КОЛОНКА: Луна-18
 Размер: 2.0х60 мм
 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: АН 40%
 Скорость подачи: 0.90 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Нормировка отклика
 Стандарт: Нет

№	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	1.666	165.94	18.50	
2	2.228	22.85	2.55	
3	2.575	26.51	2.96	
4	2.791	44.86	5.00	
5	3.135	146.87	16.37	
6	3.426	91.18	10.16	
7	3.922	23.95	2.67	
8	4.655	287.47	32.05	
9	5.112	87.22	9.72	
10	8.481	-0.22	-0.02	
10	10.01	897.06	100.00	

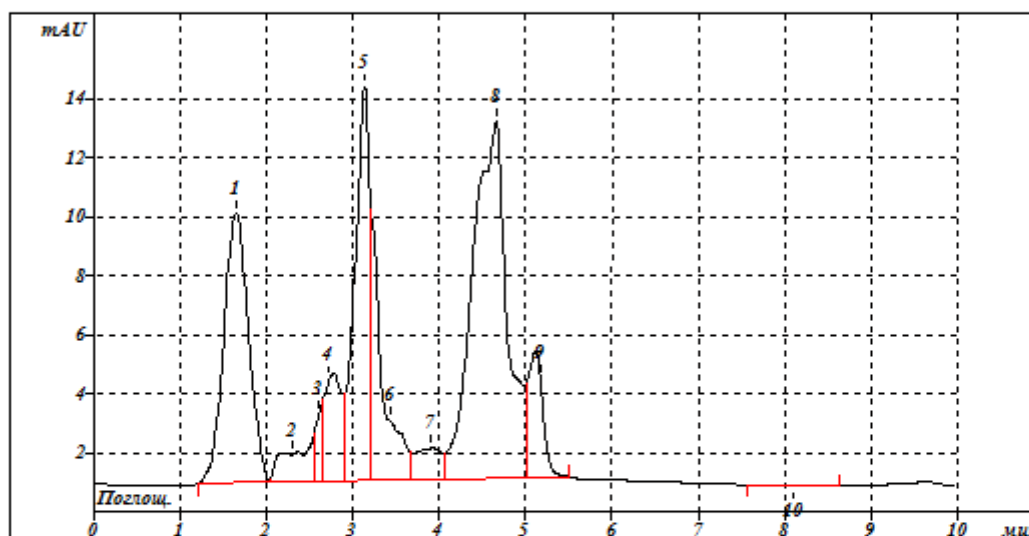
Рисунок 51 - Хроматограмма стандартного образца силимарина с концентрацией 0,05 мг/мл.

ПРОБА: образец силимарина с наночастицами

Пробирка №: 1
 Объем: 20.0 мкл
 Разведение: 1.00
 Количество: 1.00

КОЛОНКА: Луна-18
 Размер: 2.0x60 мм

ПОДВИЖНАЯ ФАЗА А: АН 40%
 Скорость подачи: 0.90 мл/мин
 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Нормировка отклика
 Стандарт: силимарин

№	Время мин	Площадь mAU*сек	Площадь %	Название
1	1.645	181.47	19.73	
2	2.284	28.85	3.14	
3	2.604	13.60	1.48	
4	2.72	47.82	5.20	
5	3.138	152.61	16.59	
6	3.43	85.70	9.32	
7	3.897	22.96	2.50	
8	4.658	337.96	36.75	
9	5.166	48.12	5.23	
10	8.103	-0.57	-0.06	
10	9.997	919.66	100.00	

Рисунок 52 - Хроматограмма препарата силимарина на основе наночастиц золота

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** **2 485 964** ⁽¹¹⁾ **C1** ⁽¹³⁾



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(51) МПК

[A61K 35/20 \(2006.01\)](#)

[A61K 33/04 \(2006.01\)](#)

[A61P 37/02 \(2006.01\)](#)

[B82B 1/00 \(2006.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: не действует (последнее изменение статуса: 17.01.2017)

(21)(22) Заявка: [2012100596/15](#), 10.01.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.01.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 10.01.2012

(45) Опубликовано: [27.06.2013](#) Бюл. № 18

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **RU 2062109 C2, 20.06.1996. WO**
2002039834 A1, 23.05.2002. US 20110150824
A1, 23.06.2011. US 20030008016 A1,
09.01.2003. US 20100322973 A1, 23.12.2010.
US 20070134298 A1, 14.06.2007. RU 2430720
C1, 10.10.2011.

Адрес для переписки:

410015, г.Саратов, ул. Ягодная, 55, А.А.
Волкову

(72) Автор(ы):

Староверов Сергей Александрович (RU),
Волков Алексей Анатольевич (RU),
Ларионов Сергей Васильевич (RU),
Степанов Виталий Сергеевич (RU),
Козлов Сергей Васильевич (RU),
Субботин Александр Михайлович (BY),
Строгов Владимир Викторович (RU),
Фомин Александр Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Староверов Сергей Александрович (RU),
Волков Алексей Анатольевич (RU)

(54) ИММУНОСТИМУЛИРУЮЩАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и ветеринарии и представляет собой иммуномодулирующую композицию для животных, которая содержит в качестве активно действующего вещества белок сыворотки молока лактоферрин, в качестве растворителя дистиллированную воду. Активно действующее вещество включает в дополнение к лактоферрину белки сыворотки молока лактоальбумин и лактоглобулин, при этом активно действующее вещество представляет собой водный раствор смеси белков сыворотки молока с концентрацией общего белка 10 г/л, содержащий 10-20% лактоферрина, 20-30% лактоальбумина, 60-70% лактоглобулина, кроме того, указанное активно действующее вещество дополнительно содержит наночастицы селена, при следующем соотношении компонентов, масс. %: водный раствор смеси белков сыворотки молока с концентрацией общего белка 10 г/л, содержащий 10-20% лактоферрина, 20-30% лактоальбумина, 60-70% лактоглобулина, - 0,1-100, наночастицы селена 0,0001-10, дистиллированная вода до 100. Изобретение обеспечивает повышение иммуностимулирующего воздействия на клеточный и гуморальный иммунитет. 3 пр., 3 табл.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 504 347** (13) **C1**



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(51) МПК
[A61D 7/00 \(2006.01\)](#)

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Статус: действует (последнее изменение статуса: 17.11.2017)
Пошлина: учтена за 7 год с 22.09.2018 по 21.09.2019

(21)(22) Заявка: [2012140353/13](#), 21.09.2012
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.09.2012
Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 21.09.2012
(45) Опубликовано: 20.01.2014 Бюл. № 2
(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: ВУ 11187 С1, 30.10.2008. RU 2418601
С2, 20.05.2011. RU 2296568 С1, 10.04.2007.
Алтухов Н.М., Афанасьев В.И., Башкиров
Б.А. и др. Справочник ветеринарного врача
Сост. Кунаков А.А., 2-е изд., перераб. и доп.
- М.: Колос, 1996. с.358-360.
Адрес для переписки:
[129329, Москва, ул. Кольская, 1, стр.1, ООО](#)
"Научно-внедренческий центр
"Агроветзащита", А.И. Филипповой

(72) Автор(ы):
[Староверов Сергей Александрович \(RU\)](#),
[Волков Алексей Анатольевич \(RU\)](#),
[Енгашев Сергей Владимирович \(RU\)](#),
[Козлов Сергей Васильевич \(RU\)](#)
(73) Патентообладатель(и):
Общество с ограниченной
ответственностью "Научно-
внедренческий центр Агроветзащита"
(RU),
[Енгашев Сергей Владимирович \(RU\)](#)

(54) **ИНЪЕКЦИОННАЯ ЛЕКАРСТВЕННАЯ ФОРМА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПЕЧЕНИ У ЖИВОТНЫХ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области фармацевтики и может быть использовано для терапии патологий печени у животных. Инъекционная лекарственная форма содержит силимарин, органический растворитель, солюбилизатор, консервант и соразтворитель при следующем соотношении компонентов, мас. %: силимарин - 1-10, органический растворитель - 5-50, солюбилизатор - 3-30, консервант - 0,01-1, соразтворитель - остальное. Инъекционная форма стабильна, нетоксична, не обладает местным раздражающим и аллергизирующим свойствами, позволит повысить биодоступность силимарина и снизить побочные эффекты. 8 з.п.ф-лы, 3 табл., 4 пр.

Изобретение относится к области фармацевтики и может быть использовано для терапии патологий печени у животных.

Широко известно, что печень является центральным органом метаболизма, в котором совершается большая часть химических процессов, связанных с обменом белков, углеводов, липидов, витаминов и минеральных веществ. Кроме того, печень активно участвует в пищеварении, дезинтоксикации токсических веществ,

15.01.2018

ИЗ №2549494

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 549 494** (13) **С1**



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(51) МПК

[A61K 31/352 \(2006.01\)](#)

[A61K 33/04 \(2006.01\)](#)

[A61K 36/28 \(2006.01\)](#)

[A61P 35/00 \(2006.01\)](#)

[B82B 3/00 \(2006.01\)](#)

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Статус: действует (последнее изменение статуса: 07.04.2017)
Пошлина: учтена за 4 год с 28.06.2017 по 27.06.2018

(21)(22) Заявка: [2014126118/15](#), 27.06.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.06.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 27.06.2014

(45) Опубликовано: [27.04.2015](#) Бюл. № 12

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске:

SINGH RP et al. Oral silibinin inhibits lung tumor growth in athymic nude mice and forms a novel chemocombination with doxorubicin targeting nuclear factor kappaB-mediated inducible chemoresistance. Clin Cancer Res. 2004; 10:8641-8647.\par SINGH RP et al. Effect of silibinin on the growth and progression of primary lung tumors in mice. J Natl Cancer Inst. 2006; 98:846-855. RU 2346685 C2, 20.02.2009\par RU 2185819 C1, 27.07.2002\par RU 2311917 C2, 10.12.2007
MIROLIAE AE¹, et al. Amelioration of experimental colitis by a novel nanoselenium-silymarin mixture.//Toxicol Mech Methods. 2011 Mar;21(3):200-8. doi: 10.3109/15376516.2010.547887. Epub 2011 Jan 20.

Адрес для переписки:

[109156, Москва, ул. Генерала Кузнецова, 19, корп. 1, кв. 365, А.Е. Коломейцевой](#)

(72) Автор(ы):

[Волков Алексей Анатольевич \(RU\)](#),
[Двоенко Александр Вилорьевич \(RU\)](#),
[Козлов Сергей Васильевич \(RU\)](#),
[Староверов Сергей Александрович \(RU\)](#),
[Хабеев Ренат Рушанович \(RU\)](#)

(73) Патентообладатель(и):

[Общество с ограниченной ответственностью "НаноФарм-про" \(RU\)](#)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ СИЛИМАРИНА И НАНОСЕЛЕНА ОКАЗЫВАЮЩЕГО ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НА РОСТ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к способу получения средства, ингибирующего рост опухолевых клеток. Способ получения средства, ингибирующего рост опухолевых клеток, включающий приготовление смеси водного раствора селенистой кислоты и ПЭГ 400, далее готовят смесь водного

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) **2 572 716** (13) C1

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(51) МПК
[A61K 9/02 \(2006.01\)](#)
[A61K 31/33 \(2006.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: прекратил действие, но может быть восстановлен (последнее изменение статуса:
07.04.2017)

(21)(22) Заявка: [2014129338/15](#), 16.07.2014(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.07.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.07.2014

(45) Опубликовано: [20.01.2016](#) Бюл. № 2(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2397753 C1, 27.08.2010. RU
2325155 C1, 27.05.2008. RU 2013156579 A,
19.12.2013.

Адрес для переписки:

[410012, г.Саратов, Театральная пл., 1,
Саратовский государственный аграрный
университет имени Н.И. Вавилова,
патентный отдел](#)

(72) Автор(ы):

[Древко Ярослав Борисович \(RU\),
Древко Борис Иванович \(RU\),
Ларионова Ольга Сергеевна \(RU\),
Козлов Сергей Васильевич \(RU\),
Ситникова Татьяна Сергеевна \(RU\)](#)

(73) Патентообладатель(и):

[Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"Саратовский государственный аграрный
университет имени Н.И. Вавилова" \(RU\)](#)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТВОРИМОЙ В ВОДЕ ФОРМЫ 2,4-ДИФЕНИЛ-7,8-БЕНЗО-5,6-ДИГИДРОСЕЛЕНОХРОМЕНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности, а именно к способу получения водорастворимой формы 2,4-дифенил-7,8-бензо-5,6-дигидроселенохромена. Способ получения водорастворимой формы 2,4-дифенил-7,8-бензо-5,6-дигидроселенохромена заключается в том, что для получения композиции берут 2,4-дифенил-7,8-бензо-5,6-дигидроселенохромен в виде порошка и к нему при температуре 45-55°C и постоянном перемешивании добавляют 2-пирролидон, после гомогенизации смеси добавляют ПАВ-ТВИН 80, бензиловый спирт, воду, доводя объем композиции до 100 мл, при этом обеспечивается возможность последующего разбавления композиции водой до соотношения 1:1000. Вышеописанный способ позволяет создать растворимую в воде форму препарата 2,4-дифенил-7,8-бензо-5,6-дигидроселенохромена, что в значительной степени упрощает его применение в качестве кормовой добавки или инъекционной формы. 1 табл.

Водорастворимая форма селеноорганического препарата для лечения и профилактики отравлений соединениями тяжелых металлов и болезней, вызванных недостатком селена у животных и птиц, которая может быть использована для инъекций.

15.01.2018

ИЗ №2557987

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 557 987** ⁽¹³⁾ **C1**



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**
(51) МПК
[A61K 33/04 \(2006.01\)](#)
[B82B 1/00 \(2006.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 17.04.2017)
Пошлина: учтена за 4 год с 28.06.2017 по 27.06.2018

(21)(22) Заявка: [2014126130/15](#), 27.06.2014
(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.06.2014
Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 27.06.2014
(45) Опубликовано: [27.07.2015](#) Бюл. № 21
(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: [RU 2372890 C2](#), 20.11.2009 . EP
[0001693052 A1](#), 23.08.2006 . [RU 2322998 C1](#),
27.04.2008 . [RU 2348666 C2](#), 10.03.2009 . [RU](#)
[2012130202 A](#), 27.01.2014
Адрес для переписки:
[109156, Москва, ул. Генерала Кузнецова, 19,](#)
[корп. 1, кв. 365, А.Е. Коломейцевой](#)

(72) Автор(ы):
[Волков Алексей Анатольевич \(RU\)](#),
[Двоенко Александр Вилорьевич \(RU\)](#),
[Козлов Сергей Васильевич \(RU\)](#),
[Староверов Сергей Александрович \(RU\)](#),
[Хабеев Ренат Рушанович \(RU\)](#)
(73) Патентообладатель(и):
**Общество с ограниченной
ответственностью "НаноФарм-про" (RU)**

**(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СРЕДСТВА ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, НА ОСНОВЕ
НАНОЧАСТИЦ**

(57) Реферат:
Изобретение относится к области фармакологии и медицины, в частности к способу получения средства внутриклеточной доставки биологически активного низкомолекулярного соединения. Способ осуществляют следующим образом: готовят смесь 1 путем внесения 250 мкл 0,5М водного раствора селенистой кислоты в 8 мл ПЭГ 400, интенсивно перемешивают на магнитной мешалке при не менее 750 об/мин, рН данной смеси - 7,55; далее готовят смесь 2 путем внесения 250 мкл 0,5М водного раствора солянокислого гидразина в 8 мл ПЭГ 400, интенсивно перемешивают на магнитной мешалке при не менее 750 об/мин, рН данной смеси - 0,68. При интенсивном перемешивании в смесь 1 вносится смесь 2 по каплям. Полученный раствор ставят на диализ против дистиллированной воды, удаляя ПЭГ 400 и солянокислый гидразин, избыток воды отгоняют на роторном испарителе при 60 об/мин и 70°C. В полученный раствор вносится низкомолекулярное соединение, выбранное из группы: гентамицин, гексаметилентетрамин, метионин, цефалексин, индол-3-карбинол, доводят рН до 7,2-7,4. При этом компоненты смешивают в количестве, обеспечивающем содержание их в средстве, в масс. %:

Биологически активное низкомолекулярное соединение
Селен

0,001-5,0
0,0001-1,0

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 549 495** (13) **C1**



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(51) МПК

[A61K 31/53 \(2006.01\)](#)

[B82B 3/00 \(2006.01\)](#)

[A61K 33/04 \(2006.01\)](#)

[A61P 43/00 \(2006.01\)](#)

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Статус: действует (последнее изменение статуса: 07.04.2017)
Пошлина: учтена за 4 год с 28.06.2017 по 27.06.2018

(21)(22) Заявка: **2014126125/15**, 27.06.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.06.2014

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **27.06.2014**

(45) Опубликовано: **27.04.2015** Бюл. № **12**

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **RU2012123673 А, 07.06.2012**

**US 5919499 А, 06.07.1999 CN 101703823 А,
12.05.2010 RU 2428192 С1, 10.09.2011 RU
2094048 С1, 27.10.1997RU 2319491 С1,
20.03.2008**

Адрес для переписки:
**109156, Москва, ул. Генерала Кузнецова, 19,
корп. 1, кв. 365, А.Е. Коломейцевой**

(72) Автор(ы):
**Волков Алексей Анатольевич (RU),
Двоенко Александр Вилорьевич (RU),
Козлов Сергей Васильевич (RU),
Ласкавый Владислав Николаевич (RU),
Староверов Сергей Александрович (RU),
Хабеев Ренат Рушанович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):
**Общество с ограниченной
ответственностью "НаноФарм-про" (RU),
Общество с ограниченной
ответственностью "БиоДжин-про" (RU)**

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ГЕКСАМЕТИЛЕНТЕТРАМИНА И
НАНОСЕЛЕНА, ОКАЗЫВАЮЩЕГО СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НА КЛЕТКИ
ОРГАНИЗМА**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области фармакологии и медицины, в том числе ветеринарной медицины, а именно к способу получения средства для стимуляции клеток организма. Способ получения средства для стимуляции клеток организма, включающий приготовление смеси водного раствора селенистой кислоты и ПЭГ 400, далее готовят смесь водного раствора солянокислого гидразина и ПЭГ 400, смешивают полученные смеси, раствор ставят на диализ против дистиллированной воды, отгоняют избыток воды, к полученному раствору вносится гексаметилентетрамин, доводят рН до 7,2-7,4, способ осуществляют при определенных условиях. Изобретение обеспечивает получение высокоэффективного, экологически безопасного средства за счет взаимного усиления воздействия коллоидного селена и гексаметилентетрамина на стимуляцию клеток организма. 1 ил., 2 табл., 4 пр.

Изобретение относится к области фармакологии и медицины, в том числе ветеринарной медицины, и может быть использовано в качестве неспецифической

15.01.2018

ИЗ №2541121

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 541 121** (13) **C1**



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(51) МПК

[A61K 31/7036 \(2006.01\)](#)
[A61K 36/28 \(2006.01\)](#)
[A61K 38/57 \(2006.01\)](#)
[A61K 47/02 \(2006.01\)](#)
[A61K 47/30 \(2006.01\)](#)
[B82B 1/00 \(2006.01\)](#)
[B82Y 5/00 \(2011.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 07.04.2017)
Пошлина: учтена за 4 год с 08.04.2017 по 07.04.2018

(21)(22) Заявка: [2014113432/15](#), 07.04.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.04.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.04.2014

(45) Опубликовано: [10.02.2015](#) Бюл. № 4

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: [US 7205002 B2](#), 17.04.2007. [WO 1990003175 A1](#), 05.04.1990. [RU 2372890 C2](#), 20.11.2009. [ВАЛУЕВА С.В.](#) "Самоорганизация и структура селенсодержащих биологически активных наносистем" [Электронный журнал "Структура и динамика молекулярных систем"](#). N10, А, 2011 г. [онлайн] [Найдено в Интернет 01.10.2013]

Адрес для переписки:

[109156, Москва, ул. Генерала Кузнецова, 19, корп. 1, кв. 365, А.Е. Коломейцевой](#)

(72) Автор(ы):

[Волков Алексей Анатольевич \(RU\)](#),
[Двоенко Александр Вилорьевич \(RU\)](#),
[Козлов Сергей Васильевич \(RU\)](#),
[Ласкавый Владислав Николаевич \(RU\)](#),
[Староверов Сергей Александрович \(RU\)](#),
[Хабеев Ренат Рушанович \(RU\)](#)

(73) Патентообладатель(и):

[Общество с ограниченной ответственностью "НаноФарм-про" \(RU\)](#)

(54) СРЕДСТВО ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО СОЕДИНЕНИЯ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтической промышленности и представляет собой средство внутриклеточной доставки биологически активного высокомолекулярного соединения, содержащее высокомолекулярное соединение, выбранное из белка сыворотки молока, пептидных фрагментов белка сыворотки молока, белка вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней, термостабильного белка туберкулина, выделенного из микобактерии *Mycobacterium bovi*, белка М1 вируса гриппа штамма PR8, белка вируса ящура VP1, наночастицы - коллоидный селен, дистиллированную воду, причем компоненты в средстве находятся в определенном соотношении в мас.%. Изобретение обеспечивает создание нетоксичного и эффективного средства внутриклеточной доставки биологически активных веществ. 2 н. и 2 з.п. ф-лы, 1 табл., 6 пр.

01.02.2018

Заявка на ИЗ №2015122674

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2015 122 674** (13) **A**



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(51) МПК
[A61K 31/00 \(2006.01\)](#)

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Состояние делопроизводства: Экспертиза по существу завершена (последнее изменение статуса: 09.08.2017)

<p>(21)(22) Заявка: 2015122674, 10.06.2015</p> <p>Приоритет(ы):</p> <p>(22) Дата подачи заявки: 10.06.2015</p> <p>(43) Дата публикации заявки: 10.01.2017 Бюл. № 1</p> <p>Адрес для переписки: 410052, г. Саратов, ул. Международная, 17, кв. 35, ООО "ХимБиоФарм"</p>	<p>(71) Заявитель(и): Общество с ограниченной ответственностью "ХИМБИОФАРИМ" (RU)</p> <p>(72) Автор(ы): Древко Ярослав Борисович (RU), Волков Алексей Анатольевич (RU), Староверов Сергей Александрович (RU), Козлов Сергей Васильевич (RU)</p>
--	---

(54) **Способ приготовления растворимой в воде формы диоксометилтетрагидропиримидина**

Формула изобретения

Способ получения растворимой в воде формы препарата 2,4-диоксо-6-метил-1,2,3,4-тетрагидропиримидина, характеризующийся тем, что для получения композиции берут препарат для достижения концентрации 2-20 мг/мл, 2-пирролидон 22-50%, ПАВ (ТВИН 80 Кремофор А25, Кремофор EL) 1-14% и поливинилпирролидон 1-10%, остальное вода.

Делопроизводство

Исходящая корреспонденция		Входящая корреспонденция	
Уведомление о необходимости уплаты пошлины	07.08.2017		
Решение о выдаче патента	13.03.2017		
Отчет об информационном поиске	23.12.2016		
Уведомление об удовлетворении ходатайства	25.05.2016	Дополнительные материалы	22.10.2015
Уведомление о положительном результате формальной экспертизы	12.05.2016		

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 645 092** (13) **C1**



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

[B82B 1/00 \(2006.01\)](#)
[A61K 31/095 \(2006.01\)](#)
[A61K 36/28 \(2006.01\)](#)
[A61K 47/22 \(2006.01\)](#)
[A61K 47/12 \(2006.01\)](#)
[A61K 47/18 \(2006.01\)](#)
[A61K 47/02 \(2006.01\)](#)
[A61P 1/16 \(2006.01\)](#)

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

Статус: действует (последнее изменение статуса: 27.02.2018)

(21)(22) Заявка: [2017135394](#), 05.10.2017

(24) Дата начала отчета срока действия патента:
05.10.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 05.10.2017

(45) Опубликовано: [15.02.2018](#) Бюл. № [5](#)

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2504347 C1, 20.01.2014. US
2010227826 A1, 09.09.2010. RU 2557992 C1,
27.07.2015. WO 2016149685 A1, 22.09.2016.
WO 2017011471 A1, 19.01.2017.

Адрес для переписки:

410033, г. Саратов, ул. Гвардейская, 23Б,
кв. 74, Староверову С.А.

(72) Автор(ы):

Староверов Сергей Александрович (RU),
Волков Алексей Анатольевич (RU),
Козлов Сергей Васильевич (RU),
Фомин Александр Сергеевич (RU),
Аифалов Владимир Эдуардович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Староверов Сергей Александрович (RU),
Волков Алексей Анатольевич (RU)

(54) Гепатопротекторная инъекционная фармацевтическая композиция на основе силимарина и наночастиц селена

(57) Реферат:

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и представляет собой гепатопротекторную инъекционную фармацевтическую композицию на основе силимарина и наночастиц селена, включающую силимарин, дистиллированную воду, отличающаяся тем, что дополнительно содержит наночастицы селена, восстановленные из селенистой кислоты с образованием коллоидного селена, при этом в качестве восстановителя для коллоидного селена используют цистеин, или аскорбиновую кислоту, или тиосульфат натрия, или меркаптоэтанол, кроме того, содержит в качестве стабилизатора pH гидроксид натрия, или гидроксид калия, или аргинин, кроме того, содержит стабилизатор для силимарина, в качестве которого используют янтарную, или фумаровую, или яблочную, или лимонную, или шавелевую кислоту. Изобретение позволяет повысить терапевтическую активность и биодоступность фармацевтической композиции на основе силимарина, снизить побочные эффекты данного лекарственного препарата при терапевтических манипуляциях. 3 ил., 1 табл., 3 пр.

Изобретение относится к области фармацевтики и может быть использовано при лечении заболеваний печени различного генеза как в человеческой, так и ветеринарной медицине.

УТВЕРЖДАЮ
 Директор ФГУП «Учхоз
 «Муммовское» МСХА им. К.А.
 Тимирязева», кандидат с/х наук
 Д.В. Ворников



УТВЕРЖДАЮ
 Проректор по научной и
 инновационной работе ФГБОУ
 ВПО «Саратовский ГАУ им. Н.И.
 Вавилова», д.э.н., профессор
 И.Л. Воротников



АКТ

**производственного испытания инъекционного
 гепатопротекторного препарата «Гепасейф» в свиноводстве**




Мы, нижеподписавшиеся представители ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова» доктор ветеринарных наук, зав. кафедрой «Терапия, акушерство и фармакология» Волков А.А., профессор кафедры Староверов С.А., ассистент кафедры «Паразитологи, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза» Авдеенко А.В. с одной стороны, и представители учхоза РГАУ-МСХА «Муммовское» Аткарского района Саратовской области гл. ветеринарный врач Романов Александр Михайлович, гл. зоотехник Бушкин Сергей Игоревич, бригадир по свиноводству Симакова Зоя Макаровна составили настоящий акт в том, что в период 3.10.13 по 19.10.13 гг. в результате проведения научно-исследовательских работ, в учхозе РГАУ-МСХА «Муммовское» Аткарского района Саратовской области проведено клиническое испытание, апробация и внедрение гепатопротекторного инъекционного препарата «Гепасейф» производства ООО «НВЦ Агроветзащита» в свиноводстве.

Объектами исследований являлись 30 голов поросят (порода «Дюрок», в возрасте 35 – 40 дней. Средняя живая масса животных составляла 8-9 кг.


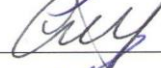

Было сформировано две опытных группы поросят, больных токсической гепатодистрофией и одна контрольная группы из клинически здоровых поросят по 10 голов в каждой.

Заключение. На основании проведенных исследований можно заключить, что препарат «Гепасейф» обладает высокими детоксикационными, гепатопротективными свойствами и является эффективным средством патогенетической терапии при лечении поросят, больных токсической гепатодистрофией.

Представители:
 ФГУП «Учхоз «Муммовское»
 МСХА им. К.А. Тимирязева»

 А.М. Романов
 С.И. Бушкин
 З.М. Симакова

Представители:
 ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ
 им. Н. И. Вавилова»

 А.А. Волков
 С.А. Староверов
 С.В. Козлов



ООО «ВТС», ИНН 645099694, 410015, Саратовская обл.,
г. Саратов, пр-т Энтузиастов, дом 26А, тел. 8(8452)25-
25-39; e-mail www.ветеринарный-доктор.pdf,
www.doctor-vet.org

АКТ

клинического испытания и внедрения гепатопротекторных препаратов силимарина СилимаринКС, СилимаринКЗ и СилимаринМ при лечении собак с острым вторичным гепатитом

25 апреля 2018 года

Мы, нижеподписавшиеся, главный врач клиники Остапчук Александр Николаевич, ветеринарный врач Абрасимовская Анна Александровна, ветеринарный врач Путина Светлана Николаевна, составили настоящий акт в том, что в период 2016-2018 гг. в результате проведения научно-исследовательских работ по теме: «Клинические испытания препаратов силимарина на основе коллоидных частиц (селена и золота) и полимерных матриц (СилимаринКС, СилимаринКЗ и СилимаринМ) при лечении собак с острым вторичным гепатитом» на базе ветеринарной клиники «DoctorVet» г. Саратов, проведено клиническое испытание и апробация препаратов СилимаринКС, СилимаринКЗ и СилимаринМ в качестве гепатопротекторного лекарственного средств для коррекции функциональной активности печени при лечении собак с вторичным гепатитом».

В исследование были включены 48 собак с диагнозом острый вторичный (бабезиозный) гепатит (32 самца и 16 самок в возрасте от 8 мес. до 6 лет разных пород, живой массой от 1,0 до 17,0 кг), пришедшие на прием в ветеринарную клинику «DoctorVet».

Критерием отбора в группу для исследований являлось наличие симптомов поражения гепатобилиарной системы и установленного на основании клинико-лабораторных исследований диагноза бабезиоз, гепатит.

Животные всех групп получали одинаковую базовую терапию по следующей схеме:

1. В качестве этиотропной терапии применяли антипротозойный препарата «Пиро-стоп» в дозе 0,05 мл/кг, подкожно в среднюю треть шеи, однократно;

3. Для снижения гипоксии тканей, нормализации коронарного кровообращения, в качестве антиаритмического, а также повышения энергетического баланса миокарда –Рибоксин в дозе 10 мг/кг, внутривенно, 1 раз в день 5 дней;

4. Для восстановления водного баланса, дезинтоксикации, поддержания плазменного объема - раствор NaCl 0,9 % в дозе 50 мл на животное, внутривенно капельно, кратность - 2 раза в день, курс – 3 - 10 дней;

5. Для регуляции углеводного обмена, нормализации проницаемости капилляров, и для поддержания процессов кроветворения и регенерации тканей, в качестве антиоксиданта - Аскорбиновая кислота 2 мг/кг на животное, внутривенно, кратность - 1 раз в день, курс – 3-10 дней;

6. Для улучшения процессов обмена веществ, антиоксической функции печени и работы сердца, для расширения кровеносных сосудов, усиление диуреза, повышения защитных сил организма животных - Глюкоза 40% в дозе 3-5 мл на животное, внутривенно, кратность – 2 раза в день, курс – 3- 10 дней;

Животным первой контрольной группы в качестве гепатопротекторного препарата назначали коммерческий препарат сравнения Гепатоджект внутримышечно, 2-5 мл на животного в зависимости от его массы, 2 раза в день - 7 дней;

Животным 2 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили водно-дисперсионный раствор силимарина (СилимаринМ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 3 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

Животным 4 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами золота (СилимаринКЗ) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме.

При сравнении результатов лечения разных групп было обнаружено достоверное снижение сроков заболевания и проявления клинических признаков заболевания в 3 опытной группе животных которым в качестве гепатопротекторного средства назначали препарат силимарина конъюгированного с наночастицами селена (СилимаринКС).

Наряду с этим, при анализе гематологических показателей крови на 14 е сутки эксперимента установлено, что положительная динамика развивается во всех группах животных.

Так количество лейкоцитов периферической крови достигло физиологических значений во всех группах животных. Однако в первой, второй и четвертой группах, которым в качестве гепатопротекторных препаратов назначали соответственно «Гепатоджект», «СилимаринМ» и «СилимаринКЗ» данный показатель был достоверно выше чем у клинически здоровых животных. Тогда как в третьей опытной группе животных которым назначали препарат силимарина конъюгированного с коллоидным селеном количество лейкоцитов не имело достоверных отличий от фоновых значений. При анализе гематологических показателей на 14 сутки эксперимента установлено достоверное увеличение количества эритроцитов и гемоглобина в периферической крови животных всех опытных групп. Однако, в группах животных которым назначали препарат сравнения «Гепатоджект» и испытуемые препараты «СилимаринМ» и «СилимаринКЗ» количество эритроцитов оставалось ниже референсных значений. Тогда как у животных 3 опытной группы данный показатель достигал физиологической нормы, хотя и оставался достоверно ниже чем в фоновой группе.

Концентрация гемоглобина во всех опытных группах животных достигала физиологической нормы через 14 суток после назначения терапевтических мероприятий. Вместе с этим, у животных которым назначали препарат «СилимаринКС» коцентрация гемоглобина была достоверно выше чем в остальных опытных группах.

При оценке биохимических показателей крови, также наблюдалась положительная динамика как ферментного спектра сыворотки крови опытных животных. Так и субстратов характеризующих функциональную активность печени.

Вместе с этим, наблюдается прямая корреляционная связь с гематологическими показателями. В третьей опытной группе динамика положительных изменений проявлялась более выражено по сравнению другими опытными группами.

Заключение

При лечении острого гепатита у собак препарат СилимаринКС показал 100% терапевтическую эффективность. Данный препарат назначался курсом в течении 7 дней, при этом видимое улучшение клинического состояния у 60% животных наблюдалось уже через 3 дня. К 7 дню лечения была отмечена полная нормализация гематологических показателей крови, значительное снижение показателей АСТ и АЛТ, восстановление значений γ -ГТФ, снижение количества общего билирубина. Меньшую терапевтическую эффективность показали препараты «СилимаринКЗ» и «СилимаринМ» соответственно.

На основании проведенных испытаний в лечебный процесс клиники «ДокторВет» для фармакологической коррекции патологий печени у собак внедрено в качестве гепатопротекторного средства препарат «СилимаринКС» в дозе 0,1 мл/кг, внутримышечно, 1 раз в день 7 дней подряд.

Главный ветеринарный врач

А.Н. Остапчук

Ветеринарный врач

А.А. Абрасимовская

Ветеринарный врач

С.Н. Путина



ООО Зоолого-ветеринарная клиника «БАГИРА»

г.Саратов, ул.Рахова, д.195/197

р/с 40702810011010103082 Филиал «Бизнес» ПАО «Совкомбанк», г. Москва

к/с 30101810045250000058

ИНН 6452124789

тел.: 934-074

e-mail: 934074@mail.ru**АКТ****клинического испытания препарата силимарина на основе коллоидных частиц селена «СилимаринКС» при лечении собак с острым вторичным гепатитом**

25 ноября 2017 года

Мы, нижеподписавшиеся директор клиники Баранов Александр Иванович, ветеринарный врач Симонян Амаля Вачиковна, ветеринарный врач Гаврилова Светлана Александровна составили настоящий акт в том, что в период 2016 - 2017 гг. в результате проведения научно-исследовательских работ по теме: «Клинические испытания препарата силимарина на основе коллоидных частиц селена при лечении собак с острым вторичным гепатитом» на базе ветеринарной клиники «Багира» г. Саратов, проведено клиническое испытание, апробация и внедрение препарата «СилимаринКС» в качестве гепатопротекторного лекарственного средства для коррекции функциональной активности печени при лечении собак с вторичным гепатитом».

В исследование были включены 24 собаки с диагнозом острый вторичный (бабезиозный) гепатит (8 самцов и 16 самок в возрасте от 8 мес., до 6 лет разных пород, живой массой от 1,0 до 17,0 кг) пришедшие на прием в ветеринарную клинику.

Критерием отбора в группу для исследований являлось наличие симптомов поражения гепатобилиарной системы и установленного на основании клинико-лабораторных исследований диагноза бабезиоз, гепатит.

После включения в исследование собак взвесили и сформировали I по принципу аналогов 2 блока по 2 животных в каждом. Последовательно основанных на весе тела, возрасте и клинических симптомах заболевания. Которых в произвольном порядке распределили в одну из 2 групп опытную и контрольную.

Животные всех групп получали одинаковую базовую терапию по следующей схеме:

1. В качестве этиотропной терапии применяли антипротозойный препарата «Пиростоп» в дозе 0,05 мл/кг, подкожно в среднюю треть шеи, однократно;

3. Для снижения гипоксии тканей, нормализации коронарного кровообращения, в качестве антиаритмического, а также повышения энергетического баланса миокарда – Рибоксин в дозе 10 мг/кг, внутривенно, 1 раз в день 5 дней;

4. Для восстановления водного баланса, дезинтоксикации, поддержания плазменного объема - раствор NaCl 0,9% в дозе 50 мл на животное, внутривенно капельно, кратность - 2 раза в день, курс – 3 - 10 дней;

5. Для регуляции углеводного обмена, нормализации проницаемости капилляров, и для поддержания процессов кроветворения и регенерации тканей, в качестве антиоксиданта - Аскорбиновая кислота 2 мг/кг на животное, внутривенно, кратность - 1 раз в день, курс – 3-10 дней;

6. Для улучшения процессов обмена веществ, антитоксической функции печени и работы сердца, для расширения кровеносных сосудов, усиление диуреза, повышения защитных сил организма животных - Глюкоза 40% в дозе 3-5 мл на животное, внутривенно, кратность – 2 раза в день, курс – 3- 10 дней;

Животным первой контрольной группы в качестве гепатопротекторного препарата назначали коммерческий препарат сравнения Гепатоджект внутримышечно, 2-5 мл на животное в зависимости от его массы, 2 раза в день - 7 дней;

Животным 2 опытной группы внутримышечно ежедневно в течение 7 дней вводили силимарин конъюгированный с наночастицами селена (СилимаринКС) в терапевтической дозе 100 мг/кг по лекарственной форме;

Методика оценки результатов лечения основывалась на определении следующих показателей: длительность лихорадки, снижения аппетита, снижения общей активности, иктеричности слизистых оболочек, результатах гематологических и биохимических исследований венозной крови.

При сравнении результатов лечения разных групп было обнаружено достоверное снижение сроков заболевания и проявления клинических признаков заболевания во 2 опытной группе животных которым в качестве гепатопротекторного средства назначали препарат силимарина конъюгированного с наночастицами селена (СилимаринКС).

Заключение. В процессе клинических испытаний и апробации было внедрено в лечебный процесс ветеринарной клиники «Багира» для фармакологической коррекции патологий печени у собак в качестве гепатопротекторного средства назначать лекарственную форму силимарина конъюгированного с нано частицами селена «СилимаринКС» в дозе 0,1 мл/кг внутримышечно, 1 раз в день 7 дней подряд.

Директор



А.И. Баранов

Ветеринарный врач

А.В. Симонян

Ветеринарный врач

С.А. Гаврилова