

КРАСНОДАРСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ВЕТЕРИНАРНЫЙ  
ИНСТИТУТ – обособленное структурное подразделение  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО  
УЧРЕЖДЕНИЯ «КРАСНОДАРСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПО ЗООТЕХНИИ  
И ВЕТЕРИНАРИИ»

На правах рукописи



**СОБОЛЕВ ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ**

**ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТА  
ЭСВЕЛАН И ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ  
ПЕЧЕНИ У СОБАК**

06.02.03 – ветеринарная фармакология с токсикологией

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, доцент

Кузьмина Елена Васильевна

Краснодар, 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

1.	ВВЕДЕНИЕ .....	4
2.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	10
2.1	Печень и ее функции .....	10
2.2	Общие принципы терапии гепатопатий .....	16
2.3	Фосфолипиды: механизм влияния на организм .....	22
2.4	Расторопша пятнистая и ее гепатопротекторные свойства.....	28
2.5	Аминокислоты (метионин): механизм действия при гепатопатиях.	37
2.6	Дигидрокверцетин: биологические свойства.....	43
3.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	49
4.	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	55
4.1	Распространение и структура заболеваний печени у собак ...	55
4.2	Состав, физико-химические свойства и стабильность эсвелана	61
4.3	Токсикологическая оценка препарата эсвелан.....	70
4.3.1	Острая токсичность.....	71
4.3.2	Хроническая токсичность.....	74
4.3.3	Местно-раздражающее действие.....	81
4.3.4	Изучение эмбриотоксических и тератогенных свойств	84
4.4	Фармакологические свойства эсвелана.....	88
4.4.1	Изучение эффективности препарата эсвелан при лекарственно-индуцированном поражении печени лабораторных животных.....	88
4.4.2	Изучение эффективности препарата эсвелан при экспериментальном поражении печени лабораторных животных тетрахлорметаном.....	95

4.5	Разработка показаний к применению препарата эсвелан .....	105
4.5.1	Изучение эффективности при лекарственном поражении печени у собак.....	105
4.5.2	Изучение эффективности эсвелана при лечении гепатоза у собак.....	111
5.	ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	127
6.	ВЫВОДЫ.....	130
7.	ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	132
8.	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	133
9.	ПРИЛОЖЕНИЯ .....	161

## 1. ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Положительная динамика в распространении гепатопатий у животных, сложность диагностики и вариативность терапевтических подходов вызывает у ветеринарных специалистов необходимость изучения этой проблемы.

Современные проблемы экологии, гиподинамия, неправильно подобранные программы кормления приводят к нарушениям обмена веществ и функции печени у животных. В последнее время, важным аспектом в этиологии гепатопатий, является массовое применение в ветеринарной практике химиотерапевтических препаратов, которые позволяют достичь не только запланированного лечебного эффекта, но и приводят к проявлению побочного, часто токсического действия, обуславливая поражение печени – центрального органа метаболизма ксенобиотиков (Антипов В.А., 2005; Минушкин О.Н., 2013; Семененко М.П., 2016; Мерзленко Р.А., 2014).

В связи с чем, потребность в лекарственных средствах, повышающих резистентность печени и нормализующих ее метаболизм в условиях напряжения детоксицирующей функции, остается высокой. При этом решающими факторами в пользу выбора препаратов подобной направленности является эффективность, безопасность и возможность длительного приема (Уразаев Д.Н., Дорожкин В.И., 2009; Мухин Н.А., 2009; Мищенко В.А., 2015; Никулин И.А., 2019).

На протяжении последних лет установлено, что одной из ключевых составляющих патогенеза при заболеваниях печени является высокая интенсивность реакций перекисного окисления липидов, при снижении уровня антиоксидантной защиты (Виноградова Л.Ф., 2000; Давыдов В.В., 2004). В этой связи при разработке новых гепатопротекторов целесообразно включение в состав веществ, проявляющих антиоксидантную активность.

По современным представлениям фармакологии эффективность гепатопротекторного средства должна также реализовываться за счет улучшения репарации мембран гепатоцитов. Учитывая то, что все клеточные мембраны примерно на 75 %, а мембрана митохондрий – на 92 % состоят из фосфолипидов, то самая большая группа гепатопротекторов в своем составе по действующему веществу имеет эссенциальные фосфолипиды (Ипатова О.М., 2005; Малявина В.В., 2007).

Исходя из этого, объектом настоящего исследования стал разработанный препарат, включающий эссенциальные фосфолипиды и вещества с гепатопротекторным и антиоксидантным действием, а предметом – его гепатопротективные свойства.

**Степень разработанности проблемы.** Решению проблемы фармакокоррекции гепатопатий у животных посвящено множество научных исследований, как отечественных, так и зарубежных ученых – Б.В. Уша (1979-2008), В.Н. Байматов (1982-2000), Ю.Н. Алехин (1990-2011), Е.В. Душкин (2009-2012), И.П. Кондрахин (1989-1991), И.И. Калюжный (2007-2011), Р.А. Мерзленко (2012-2014), Е.В. Кузьминова (2011-2019), М.П. Семенов (2016-2018), И.А. Никулин (2011-2018), С.В. Козлов (2012-2016), Н.Л. West (1989-1990), S.A. Center (2010) и многих других.

Однако, несмотря на имеющиеся разработки, ассортимент отечественных препаратов для лечения заболеваний печени у животных крайне недостаточен и практикующие ветеринарные врачи нередко сталкиваются с проблемой отсутствия эффективных и при этом доступных по цене гепатопротекторов. Все вышеизложенное послужило основанием для определения цели исследования и решения, связанных с ней задач.

**Цель и задачи исследований.** Цель работы – разработка гепатопротекторного препарата, изучение его фармако-токсикологических свойств и эффективности при заболеваниях печени у собак.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- провести мониторинг распространённости и структуры заболеваний печени у собак в условиях клиник города-курорта Анапы Краснодарского края и города Советская Гавань Хабаровского края;
- разработать состав препарата эсвелан, изучить его физико-химические свойства, стабильность и определить срок годности;
- провести доклинические исследования эсвелана, включающие токсикологическую оценку, а также изучение гепатопротекторной активности при экспериментальном поражении печени лабораторных животных;
- изучить эффективность эсвелана при лекарственном поражении печени собак;
- определить эффективность препарата при гепатозе собак.

**Научная новизна.** В результате проведенных исследований в сравнительном аспекте изучена структура заболеваний печени у собак в условиях клиник Краснодарского и Хабаровского края. Разработан и стандартизирован препарат эсвелан, установлен срок его годности. Впервые проведено определение комплекса токсикологических показателей эсвелана, позволившее выявить степень безопасности применения препарата. Определено гепатопротекторное действие препарата на двух экспериментальных моделях повреждения печени лабораторных животных – тетрациклином и тетрахлорметаном. Разработаны подходы к снижению гепатоповреждающего эффекта от длительного применения преднизолона собакам, основанные на применении гепатопротекторов. Установлена эффективность эсвелана при терапии хронического жирового гепатоза у собак.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Теоретическая значимость работы заключается в том, что были изучена степень взаимодействия комплекса веществ, имеющих разноплановый механизм действия с гепатобилиарной системой организма животных.

Для ветеринарной медицины предложен новый гепатопротекторный препарат эсвелан, позволяющий сократить сроки лечения и достигнуть положительных результатов при терапии заболеваний печени у собак.

Проведённые исследования содержат новое решение проблемы снижения побочных эффектов при длительном применении синтетических глюкокортикостероидов, заключающееся в мониторинге состояния печени у животных и дополнительном применении препаратов гепатопротекторного действия (в качестве средств сопровождения при проведении комплексного лечения). Использование эсвелана на фоне гормональной терапии оказывает превентивное действие на развитие лекарственно-индуцированных поражений печени у собак.

По результатам научных исследований разработана нормативная документация (временная инструкция по применению), определяющая условия применения эсвелана, утвержденная в установленном порядке.

Изложенные в диссертационной работе материалы могут быть использованы при составлении научно-информационной литературы, в учебном процессе сельскохозяйственных ВУЗов, а также в ветеринарной терапевтической практике.

**Методология и методы исследований.** Методологической основой выполнения работы явилось изучение вопросов современной фармакокоррекции патологических процессов гепатобилиарной системы, представленные в работах отечественных и зарубежных ученых.

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

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

- распространённость и структура заболеваний печени у собак в условиях клиник города-курорта Анапы Краснодарского края и города Советская Гавань Хабаровского края;
- состав, физико-химические свойства и контроль качества эсвелана;
- токсикологическая оценка препарата;
- изучение гепатопротекторной активности эсвелана на экспериментальных моделях повреждения печени лабораторных животных – тетрациклином и тетрахлорметаном;
- эффективность эсвелана при лекарственно-индуцированном поражении печени у собак;
- эффективность препарата при жировом гепатозе собак.

**Степень достоверности и апробация работы.** Основные положения, заключение и практические предложения, сформулированные в диссертации, отвечают целям и задачам работы, а достоверность полученных результатов проанализирована и подтверждается статистической обработкой данных.

Материалы исследований, полученные при выполнении диссертации, были представлены и обсуждались: на заседаниях Ученого совета Краснодарского НИВИ (2014-2019 гг); Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института (Краснодар, 2016); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве» (Екатеринбург, 2017); Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых, посвященный 95-летию Кубанского ГАУ и 80-летию со дня образования Краснодарского края «Научное обеспечение агропромышленного комплекса» (Краснодар, 2017); Международной научно-практической конференции «Научные основы повышения продуктивности и здоровья сельскохозяйственных животных» (Краснодар, 2018); Международ-

ной научно-практической конференции «Пенитенциарная система и общество: опыт взаимодействия» (Пермь, 2018); Международной научно-практической конференции «Наука, образование и инновации для АПК: состояние, проблемы и перспективы» (Майкоп, 2019); Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и методические подходы к диагностике, лечению и профилактике болезней животных» (п. Персиановский, 2019).

**Личное участие автора.** Все приведенные в диссертации данные получены при личном участии автора, как на этапе постановки задач и разработки методических подходов к их выполнению, так и при наборе первичных фактических данных, статистической обработке и анализе полученных результатов, написании и оформлении публикаций. Выводы диссертации сформулированы автором.

**Публикации.** Результаты диссертационных исследований опубликованы в 15 научных работах, из них 5 – в рецензируемых научных изданиях, входящих в Перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций (рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ) и 1 статья, входящая в международную библиографическую и реферативную базу данных «Scopus».

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 161 странице машинописного текста и состоит из разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, собственных исследований, заключения, выводов, практических предложений, списка литературы, приложения. Список использованной литературы включает 253 источника, в том числе иностранных – 75. Работа иллюстрирована 29 таблицами и 27 рисунками.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1 Печень и ее функции

Внутренние незаразные болезни у собак составляют около 35-40 % от общей патологии, из них на болезни печени приходится около 25-30 %. Рост заболеваемости гепатопатиями обусловлен «одомашниванием» животных – изменением их кормления, недостаточной физической нагрузкой, массовым применением лекарственных средств (Денисенко В.Н. 2006; Шавырин Д.И., 2009; Ozturk Y., 2014).

Печень это основной орган гомеостаза организма, так как в ней создается общий обменный и энергетический комплекс всего метаболизма веществ. Происходящие в печени обменные процессы осуществляются максимально интенсивно, и из-за этого она потребляет значительное количество кислорода – за один час через печень проходит порядка ста литров крови. Об интенсивности обменных процессов в печени говорит и тот факт, что ее белки обновляются всего за семь дней, а в других органах этот процесс происходит за семнадцать суток и дольше (Кузнецов Н.И., 1990; Жаров А.В., 2001; Алехин Ю.Н., 2011).

Б.В. Уша (1979) характеризует ведущие функции печени: жёлчеобразование и жёлчевыделение; инактивация ядов; участие в водном обмене, метаболизме жиров, белка, углеводов, микроэлементов, витаминов, ферментов, пигментов. Считается, что общее количество функций печени доходит до тысячи (В.Н. Байматов, 1982; Брюгер А.Ф., 1984).

Ведущие процессы белкового обмена реализуются в печени. Основная доля белков крови – альбуминов, глобулинов и белки гемостатической системы крови (протромбин, фибриноген, проконвертин и т.д.) синтезируются в этом органе (Баранов Н.П., 1984; Голиков П.Д., 2004; Карташева О.Я., 2000).

В процессе белкового обмена происходит переаминирование и дезаминирование аминокислот, нуклеопротеидный катаболизм, трансформация ядовитых продуктов в малотоксичные (Уша Б.В., 1979; Мансуров Х.Х., 1981; Бабкина Т.Н., Миронова Л.П., Ленкова Н.В., 2019).

Печень является основным органом, обеспечивающим процесс синтеза мочевины и связывания аммиака. Только там выявлены ферменты орнитинового цикла, необходимые для синтеза мочевины. Аммиак проявляет токсическим воздействием на организм, из-за чего гепатопатологии сопровождаются изменением орнитинового цикла, приводящего к выделению свободного аммиака и развитию токсикозов (Кузнецов Н.И. и др., 1998; Мерзленко Р.А. и др., 2013).

Метаболизм углеводов в печени имеет первостепенную функцию. У крупного рогатого скота не менее 65 % сахаров сбраживается в рубце с образованием пропионовой кислоты, которая в печени трансформируется в гликоген и потом в щавелевоуксусную кислоту. Виды метаболизма углеводов, реализуемые печенью – превращение галактозы в глюкозу, синтез и распад гликогена, глюконеогенез, окисление глюкозы, при этом печень является главным регулятором уровня сахара в крови (Денисенко В.Н., 2002; Подымова С.Д., 1993).

В печени реализуются основные реакции метаболизма липидов. Клетки печени осуществляют захват липидов и липопротеинов из венозной и артериальной крови поэтому в печень поступают липиды экзогенного и эндогенного происхождения (в том числе образующиеся при липолизе жировой ткани). В печени происходит синтез основных метаболитов липидного обмена, в том числе окисление жирных кислот, а также образование кетоновых тел, которые в значительной степени зависят от физиологического статуса животного, уровня и характера кормления (Е.В. Душкин, 2007; Подымова С.Д., 1993).

Осуществляемый печенью липидный обмен состоит из двух последовательных этапов – сначала эмульгирование, а потом гидролиз молекул триглицеридов под действием липаз. Согласно данным исследований Л.Ф. Виноградовой (2000) в гепатоцитах насыщенные жирные кислоты превращаются в ненасыщенные, и там же осуществляется метаболизм холестерина, образуются фосфолипиды, синтез и выведение липопротеидов разной плотности.

Липидный обмен в печени жвачных имеет характерные особенности относительно моногастричных животных, что обусловлено различием пищеварения в преджелудках. Это относится к синтезу жирных кислот, поскольку печень жвачных имеет свойство к более низкому использованию глюкозы для синтеза жирных кислот. При этом увеличивается роль уксусной кислоты являющейся субстратом для синтеза высокомолекулярных жирных кислот (Калюжный И.И., Баринов Н.Д., Рябова Е.В., 2011; Павлов Ч.С. и др. 2005).

Печень является основным звеном пигментного обмена, доказана ее ключевая роль в обмене гемохромогенных пигментов, образующихся при распаде гемоглобина, а также в малых количествах миоглобина, цитохромов и др. (Башкатова Н.А., Миронова Л.П., 2005).

Пигментный обмен в организме лежит в основе биотрансформации билирубина. Распад гемоглобина до билирубина это многоступенчатый комплекс окислительно-восстановительных реакций, имеющий значительное количество промежуточных метаболитов. Неконъюгированный (свободный, непрямой) билирубин обладает токсичными свойствами поскольку, будучи лиофильным веществом легко проникает в митохондрии, где нарушает проницаемость мембран, синтез белка, тормозит процессы окислительного фосфорилирования. Прямой билирубин может обуславливать нарушение центральной нервной системы, приводить к некрозу печени и гемолизу эритроцитов (Яковенко Э.П. и др., 2011; Калюжный И.И., 2007; Мерзленко Р.А. и др., 2013).

Возрастание билирубина в крови наблюдается при поражении паренхимы печени различного генеза, поскольку при патологическом изменении гепатоцитов нарушается экскреция прямого билирубина с желчью и тогда он попадает прямо в кровяное русло, что и обуславливает увеличение его концентрации (Б.В. Уша, 1972).

Одна из главных функций печени – выработка желчи роль, которой настолько значима, что нарушение ее выделения в двенадцатиперстную кишку изменяет процесс усвоения всех питательных веществ, витаминов, микроэлементов, а также ведет к нарушению всех функций кишечника. Жёлчь тормозит размножение бактерий, что оказывает превентивное действие на развитие гнилостных процессов в ЖКТ; участвует в пристеночном пищеварении, эмульгирует жиры, т.е. дробит крупные капли жира на более мелкие; активизирует фермент липазу, вырабатываемую поджелудочной железой; стимулирует сокращение стенок кишечника (Е.А. Кесарева, В.Н. Денисенко, 2004; Р.А. Мерзленко, М.Н. Заздравных и др., 2012).

Печень принимает участие в процессе инактивации гормонов, что предупреждает их избыточное накопление. Ее немаловажная функция заключается в поддержании кислотно-основного состояния организма. Печень принимает участие в процессе кроветворения, так как в период эмбрионального развития она связана с сосудистой системой и является мощным депо крови, в дольке печени смешивается артериальная и венозная кровь. Функции печени позволяют экскретировать продукты распада гемоглобина и депонировать железо, которое затем вновь используется для синтеза гемоглобина. В печени синтезируется белок протромбин, который принимает участие в процессе свертывания крови, также в гепатоцитах накапливается гликоген (Минушкин О.Н., Масловский Л.В., Фролова А.А., 2013; Оробец В.А., Беляев В.А. и др., 2012).

Печень относится к органам теплопродукции. При оптимально протекающих функциях в печени организм адекватно реагирует на колебания тем-

пературы окружающей среды (гипо- или гипертермию). Суть адаптации осуществляются за счет изменений уровня обменных процессов, что сопровождается изменениями в морфо-биохимическом профиле крови (Беляев В.А. и др., 2009; Гарбузенко Д.В., 2008).

Способность печени к детоксикации осуществляется, во-первых, способом химического превращения веществ, что приводит к снижению их токсичности, во-вторых, путем активизации выделения ксенобиотиков, что реализуется при обмене веществ, такими составляющими гепатоцитов как эндоплазматическая сеть и митохондрии. Процесс детоксикации может осуществляться за счет механизмов окисления, восстановления, ацетилирования, метилирования и др. (Абдуллаев Ш.М., 1985; Байматов В.Н., 1990).

Механизм поражения печени прямыми ксенобиотиками выглядит так: токсичные метаболиты, преодолевая механизмы клеточной защиты, повреждают клетки-мишени и приводят к нарушению клеточных функций и ее гибели. Клеточная смерть может наступить в результате 4 механизмов:

- а) нарушение плазматической мембраны и цитоскелета;
- б) изменение митохондриальных функций;
- в) поражение внутриклеточного ионного гомеостаза;
- г) активация разрушения ферментов (Давыдов В.Ф., 1980; Моисеев В.С., 2005).

В нормальных условиях функционирования печени приоритетной системой для нейтрализации ксенобиотиков является система цитохромов и монооксигеназ, расположенная в агранулярной эндоплазматической сети, которая метаболизирует липофильные химические соединения в гидрофильные, а также осуществляет биотрансформацию лекарств (Лабезник Л.Б. и др., 2009).

При поражении печени происходит развитие двух основных синдромов – холестаза и цитолиза. Цитолизом обозначают процесс разрушения клеток, выражающийся в полном и (или) частичном растворении их под действием лизосомальных ферментов (В.В. Давыдов, И.В. Захарченко, В.Г. Овсянников,

2004). Он также как и апоптоз, является естественным процессом, но при повреждении клетки внешними факторами уже определяется как патологический. При цитолизе происходит переход воды внутрь клетки и в результате разрывается ее оболочка. Индикаторами цитолиза гепатоцитов является повышенное содержание энзимов – аланинаминотрансферазы, аспаратамино-трансферазы,  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы, лактатдегидрогеназы, щелочной и кислой фосфатаз (Блюгер А.Ф., Новицкий И.Н., 1988; Венгеровский А.И., Маркова И.В., 1999).

Механизмам гибели клеток делятся на некроз и апоптоз. Некроз начинается с нарушения плазматической мембраны, потом следует набухание митохондрий, выход внутриклеточных составляющих, дезинтеграция ядра и фагоцитоз погибших гепатоцитов. Гибель клетки происходит на фоне активного воспаления при повреждении близлежащих тканей. Основной причиной некроза является окислительный стресс и процессы пероксидации липидов, провоцирующие повреждение митохондрий и нарушение цитоскелета.

Апоптозом называют генетически запрограммированный процесс, при котором клетка сама идет к своей смерти. Механизм запускается по специфическим «рецепторам смерти», расположенных на поверхности клетки. В отличие от некроза, при апоптозе воспалительный процесс не развивается (Твердохлиб В.П., 2010; Денисенко В.Н., 2006; Драпкина О. М. и др., 2010).

Отмирание гепатоцитов происходит в несколько этапов. Первоначально нарушается плазматическая мембрана, далее набухают митохондрии и происходит дезинтеграция ядра с дальнейшим фагоцитозом погибших клеток. Доказано, что из-за значительной способности к саморегенерации, пораженные участки печени уничтожаются и заменяются новыми, что приводит к восстановлению структуры и функции органа. При этом процессы восстановления печени возможны только до определенного момента, ограничивающим фактором будет количество гепатоцитов – пока их количество не ста-

нет критически ничтожным (Y. Liang et al., 2005; Бурлакова Е.Б., Храпова Н.Г., 1985; Машковский М.Д., 2002).

Все вышеописанные функции печени нельзя рассматривать изолированно, так как в ходе межуточного обмена различных веществ эти функции взаимно дополняют друг друга.

## **2.2 Общие принципы терапии гепатопатий**

Уникальность печени заключается в способности регенерировать до 60-70 % от исходной величины уже спустя два месяца после экстирпации, что определяет возможность успешной терапии гепатопатий.

При патологии гепатобилиарной системы терапия больных животных должна осуществляться комплексно и, в первую очередь, быть нацеленной на устранение причины болезни, активизацию общего метаболизма, регенерацию гепатоцитов, восстановление функций печени, при оптимизации физиологического оттока желчи, нивелировании процессов воспаления и некроза, с возможностью угнетения микрофлоры в желчевыводящих протоках. В каждом индивидуальном и конкретном случае назначаемое животному лечение зависит от правильности диагноза, этиологии и клинических проявлений заболевания (Демина, Н.Б. и др., 2007).

Лечащему врачу для эффективной терапии необходимо применять комплекс мероприятий, обеспечивающих хорошую детоксикационную функцию органа, и направленных на восстановление белкового, жирового и углеводного обменов организма (Душкин Е.В., 2012).

Подход в комплексной терапии гепатопатологии складывается из следующих принципов – покой, питание и фармакокоррекция. При этом целью диетотерапии является пополнение питательных веществ и энергии, обязательных для поддержания потребностей организма животного и обеспечивающих регенерацию клеток печени пластическим материалом. Важным фактором является необходимость правильного лечения осложнений из-за дис-

функции печени. К ведущим принципам фармакокоррекции гепатопатий относят: устранение (при возможности) этиологического фактора заболевания, поддержание гомеостаза организма, улучшение детоксикации, активизация регенерации органа (Терновой К.С., Бутылин Ю.П., Бобылев Ю.И., 1984).

При гепатопатиях инфекционной природы в лечении используют гипериммунные сыворотки и антимикробные препараты, а если причина инвазионная – противопаразитарные средства. При этом важно, чтобы лекарства не имели гепатотоксического действия.

Целью антибиотикотерапии, достигаемой при заболеваниях гепатобилиарной системы, является:

- 1) угнетение инфекции и предотвращение размножения печеночной флоры;
- 2) сдерживание микрофлоры кишечника, что даст возможность уменьшить концентрацию аммиака и образование летучих жирных кислот (Зайцев С.Ю., Конопатов Ю.В., 2004).

К основным векторам профилактики и лечения гепатопатий относится применение лекарственных препаратов, защищающих печень от воздействия повреждающих факторов и ускоряющих ее восстановление – «гепатопротекторов» (Корсун В.Ф. и др., 2005; Лебедев С.В., Сизова Е.А., 2008).

Общепринятой классификации препаратов-гепатопротекторов нет, но самой распространенной является классификация, представленная Дегтяревой И.И. (2001):

- 1) препараты растительного происхождения биофлавоноидной структуры;
- 2) препараты эссенциальных фосфолипидов;
- 3) препараты аминокислот;
- 4) препараты желчных кислот;
- 5) синтетические средства;
- 6) препараты разных групп;
- 7) препараты с опосредованным гепатопротекторным эффектом;
- 8) гомеопатические средства.

Чаще используется упрощенная классификация гепатопротекторных препаратов – в зависимости от химического состава и происхождения:

1. препараты растительного происхождения;
2. препараты животного происхождения;
3. препараты, содержащие эссенциальные фосфолипиды;
4. аминокислоты или их производные;
5. витамины, антиоксиданты и витаминоподобные соединения;
6. препараты разных групп (Машковский М.Д., 2002; Center S.A., 1998).

В качестве гепатопротекторов чаще всего используются растительные средства (около половины), потом следуют синтетические препараты и на основе аминокислот (тридцать процентов). На долю лекарств, включающих фосфолипиды, приходится примерно 16 % от общего показателя «истинных» гепатопротекторов (Моисеев В.С., 2005; Джавахян М.А., Канунникова Ю.С., 2012).

Современные представления медицины подтверждают данные о том, что фармакологический эффект гепатопротекторных препаратов должен реализовываться различными механизмами:

- антиоксидантная активность – это витамины (такие как ретинол, витамин Е, пантотеновая кислота и др.), тиолы (цистеин, N - ацетилцистеин), препараты на основе растительных полифенолов;
- активизация процессов репарации мембран гепатоцитов – лекарства на основе фосфолипидов;
- улучшение регенерации паренхимы печени (метионин, оротовая кислота кальция пангамат, цитидин) (Саратиков А.С. и др., 2005; Center S.A., 1998).

Гепатопротекторы позволяют устранять ключевые механизмы повреждения печени за счет ингибирования фосфолиполиза, снижения уровня липофосфатидов, восстановления нарушенной структуры мембран и барьерной функции мембран митохондрий, оптимизации депонирования ионов кальция, репарации эндоплазматического ретикулума и лизосом. Восстановление кле-

точного метаболизма нормализует обмен липидов, белков, углеводов, а также основные функции печени – антитоксическую, экскреторную и др. (Королева Л.Р., 2005; Звенигородская Л.А., Черкашова Е.А., 2011; Pradhan S.C., Girish S., 2006).

К механизмам действия гепатотропных препаратов относится снижение свободнорадикального окислительного повреждения гепатоцитов. Генерация свободнорадикальных процессов и соответствующая ответная реакция тканей и систем организма носит название окислительного стресса, который возникает из-за нарушения баланса между чрезмерным уровнем свободных радикалов и нивелирующей способности антиокислительной системы (Блюгер А.Ф., Новицкий И.Н., 1984; Гонский Я.И., Корда М.М., Клиш И.Н., 1996; Chang G.W., Kam P.C., 1999; Казимирко В.К. и др., 2004; Chanussot F., Venkoel L., 2003).

Эффективность фармакологических средств, включающих антиоксиданты, реализуется за счет того, что продукты ПОЛ обуславливают почти все механизмы нарушения клеток печени. Фенольные антиоксиданты представлены флавоноидами, полифенолами, жиро- и водорастворимыми витаминами, серосодержащими аминокислотами – в том числе метионином и цистеином (Кузьминова Е.В., Семенов М.П., 2005-2010; Мерзленко Р.А., Добрунов Р.А., 2014; Chaudhury S., Mehendale H.M., 1991; Par A., Roth E., Rumi G. Jr. et al., 2000).

К важным факторам развития патологических процессов при болезнях печени относят образующиеся в результате нарушений обмена веществ и пищеварения эндотоксины. В борьбе с эндотоксикозом результативно применение пробиотиков, которые нивелируют дисбактериоз, снижают броодильные и гнилостные процессы в кишечнике, а также нормализуют его моторную и секреторную функции (Бабак О.Я., 2008; Kumar Ashwani, 1988; Kurchenko V., Pronskaya I., Piculev A., 1991).

Другим направлением терапии, нацеленным на предотвращение всасывания токсинов из кишечника, является применение энтеросорбентов, таких как энтеросорб, энтеродез, аминодез, активированный уголь, каолин, магния трисиликат и другие. Энтеросорбенты необходимо растворить в воде и выпавать в течение 5-8 суток больным животным. В наиболее тяжелых случаях дополнительно назначают гемосорбенты альбумет, гемодез и др. (Lang I., Deak G., Nekam K. et al., 1988; M. Mari, A. Colell, A. Morales et al., 2010).

В группе гепатопротекторов наиболее значимая часть препаратов в качестве основных действующих компонентов имеет вещества растительного происхождения. Наиболее распространен в этом качестве силимарин, который получают из расторопши пятнистой (*Silybum marianum*). К действующим веществам силимарина относят силибин А и В, изосилибин А и В, изосиликристин, силикристин и силидианин. Эти вещества, взаимодействуя с мембранами гепатоцитов, оказывают ингибирующее действие на активность цАМФ и кальций зависимого процесса активации фосфолипаз, что позволяет достичь цитопротективного эффекта на гепатоциты. Помимо этого, силимарин активизирует синтез белка и регенерацию печени, в том числе, из-за структурного сходства со стероидными гормонами (Георгиевский В.П., 1990; V.J. Chrungoo, K. Singh, I. Singh, 1997).

Из лекарственных препаратов, представленных растениями, гепатопротекторными свойствами обладают фитоадаптогены (такие как элеутерококк, родиола розовая, женьшень, лимонник и т.п.) – они повышают неспецифическую резистентность и адаптационные свойства организма (Запесочная Г.Г., Баньковский А.И., 1969).

К фармакологическим качествам фитоадаптогенов относится их свойство проявлять широкое неспецифическое действие – а именно, расширять границы адаптации организма к многочисленным экстремальным факторам, а также способность защищать ткани от деструкции, в том числе за счет ан-

тиоксидантного и мембраностабилизирующего действия (Десятник В.И., 1990; Coon J., 2004).

К перспективным гепатопротекторам также относятся препараты, включающие глицирризиновую кислоту, которая является основным активным компонентом корня солодки. К фармакологическим качествам глицирризиновой кислоты относится иммуномодулирующее и противовоспалительное действие. Она ингибирует воспалительные реакции, снижает сосудистую проницаемость, проявляет антипролиферативное действие. Ряд авторов считают, что гепатопротекторный эффект глицирризиновой кислоты реализуется во многом за счет ее антиоксидантных качеств – в гепатоцитах она может инактивировать ферменты, инициирующие перекисное окисление (Никитин И.Г., 2007; С.В. Оковитый и др., 2010; .R. Cholbi, M. Paya, H.Y. Alcaras, 1991).

В патогенетической терапии гепатопатий желчегонным средствам, способным активизировать секрецию желчи и выход ее в двенадцатиперстную кишку, отводится особое место. К веществам, оказывающим стимулирующее действие на образование желчи (холеретики), относят – аллохол, холосал, кислоту дегидрохолевую, рыльца кукурузы, дехолин, холензим и др. К веществам, повышающим уровень жидкой части желчи, относят соляную кислоту, субар, салицилаты и ряд других. Йод, сульфаниламиды, антифюотики усиливают антимикробное действие желчи. Берберина сульфат, атропина сульфат, холагол, папаверина гидрохлорид, соль карловарская и др. способствуют выходу желчи в кишечник (холекинетики). Холин, тиолин, викасол, витамин К в результате своего противовоспалительного действия увеличивают выход желчи (Калюжный, И.И., 2007; Махов В.М., Соколова А.А., 2011; Watkins, M.D., 1990).

В гуманной медицине при консервативном лечении желчнокаменной болезни для растворения желчных камней используется урсодезоксихолевая кислота, которая обладает гепатопротекторной, антихолестатической, иммуномодулирующей, гипохолестеринемической, литолитической и антиапо-

птической эффективностью (Толстикова Г.А. и др., 1997; Ranson M. et al., 2002).

Также часто используются препараты животного происхождения, являющиеся продуктом гидролиза тканей печени крупного рогатого скота, усиленные различными веществами с антиоксидантными и детоксикационными свойствами, с целью активизации регенерации паренхимы печени (Мерзленко Р.А., 2014; Никулин И.А., 2005; Shaun D.B., 1992).

Таким образом, лекарственные средства, применяемые в терапии гепатопатий, должны в первую очередь защищать клетки печени от негативного воздействия повреждающего фактора, и в последующем способствовать регенерации гепатоцитов и стимулировать их детоксикационную функцию.

### **2.3 Фосфолипиды: механизм влияния на организм**

Фосфолипиды организма являются мембранными липидами, при этом их содержание варьирует от 40 до 90 % от общего уровня липидов. Их формула состоит из длинноцепочечных насыщенных или ненасыщенных жирных кислот. Индивидуальной чертой фосфолипидов является фосфатная группа, к которой добавлен специфический полярный компонент – азотистые основания (этаноламин или холин), аминокислотный остаток (серин) или углеводный фрагмент инозит (Ипатова О.М., 2005; Кунц Э., Гундерманн К., Шнайдер Э., 1994; Бергельсон Л.Д., 1982; Tanaka Y., Schroit A.J., 1971-1983).

Несмотря на отличия в строении отдельных классов фосфолипидов, все они структурированы по одинаковому принципу – выделяется полярная «головка» и два гидрофобных «хвоста» (Рис. 1).

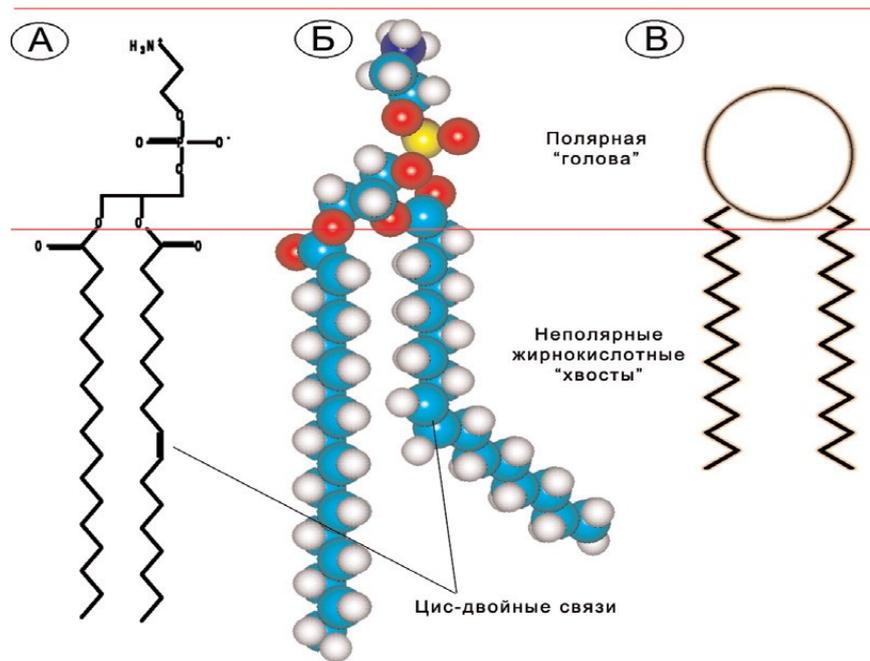


Рис. 1 – Структура молекулы типичного глицерофосфолипида  
 А – химическая формула; Б – пространственное расположение атомов;  
 В – условное изображение

При этом у фосфолипидов «головка» является гидрофильной, а «хвосты» гидрофобным. Это качество позволяет при нахождении в водной среде образовывать бислой – то есть двойной слой фосфолипидных молекул, у которых гидрофильные головки с обеих сторон граничат с водой, а гидрофобные хвосты помещены внутри бислоя, что позволяет тем самым защитить их от контакта с водой. Все это обуславливает основное качество фосфолипидов – амфифильность, то есть сродство к полярной (водной) и к гидрофобной (жировой) средам (Малявина В.В., Томилина С.А., Сампиев А.М., 2007; Bevers E.M, Comfurius P., Zwaal R.F., 1983).

В естественных глицерофосфолипидах лимитирован набор полярных групп, а их качество распределяет основные классы: фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозит и фосфатидилглицерин (Honkakoski P., 1992; Imai T., Kageyama Y., Tobar J., 1995).

Из предложенной в 1972 году Сингером и Николсоном жидкомозаичной модели видно, что фосфолипиды в мембранном слое имеют вид двойно-

го слоя (бислоя), образующего жидкую или точнее жидкокристаллическую матрицу (рис. 2). При этом индивидуальный слой фосфолипидов обращен жирнокислотными цепями внутрь бислоя, формируя гидрофобную фазу, а полярные гидрофильные «головки» фосфолипидов повернуты наружу и внутрь клетки. Белки пронизывают всю мембрану или «плавают» внутри нее. Такая мембрана обладает определенной текучестью, обусловленной латеральной диффузией липидных и белковых молекул (Avogaro H., Catapano A., 1983; Pulfer M., Murphy R.C., 2003).

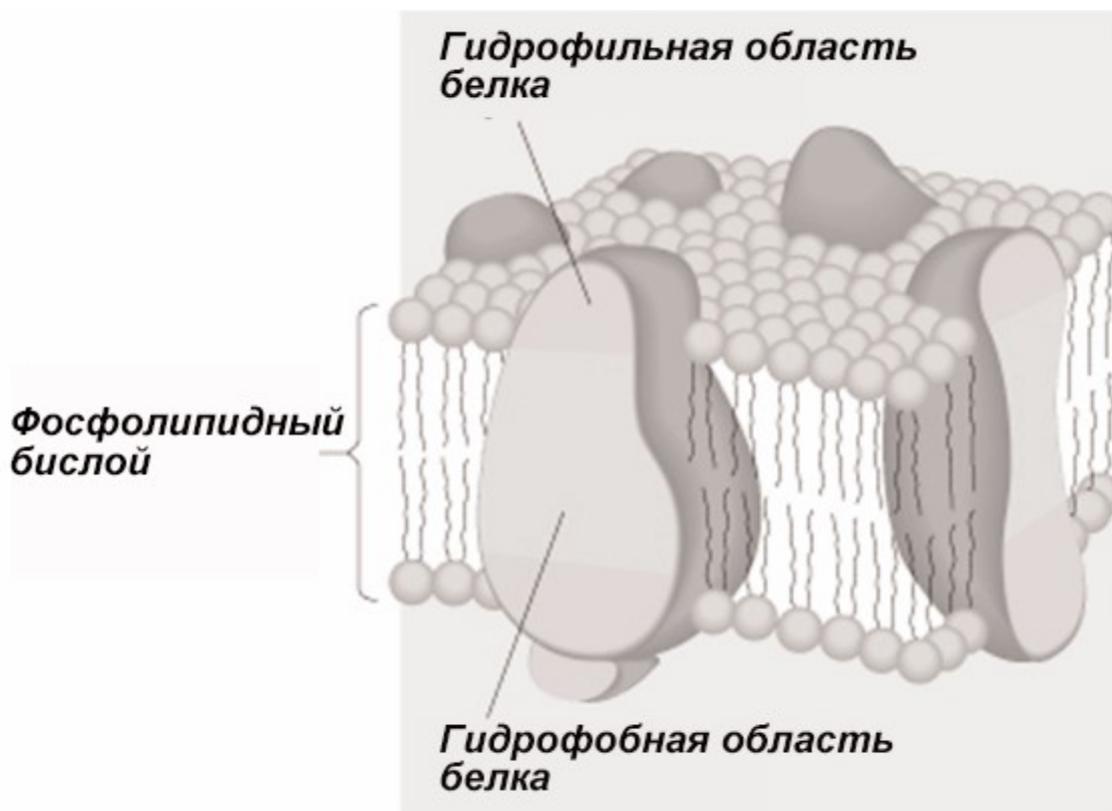


Рис. 2 – Жидкокристаллическая модель мембраны

Фосфатидилхолин (лецитин) относится к фосфолипидам наиболее значимо представленным в структурах клеток организма, так как его концентрация может достигать около половины от общего уровня фосфолипидов. Фосфатидилхолин является важнейшим «строительным блоком» мембран и субклеточных органелл. Также он является ведущим фосфолипидом, циркулирующим в биологических жидкостях организма и интегральным компонентом липопротеинов (Kinjo J., Hirakawa T., 2003). Лецитин дополнительно

имеет ряд функций – а именно, служит предшественником для других видов фосфолипидов, а также является источником множества биоактивных соединений. Концентрация фосфатидилхолина в липопротеинах значимее, чем в мембранах клеток. Самое высокое содержание фосфатидилхолина установлено в легких, печени и селезенке (Арчаков А.И., Бородин Е.А., 1986; Gundermann K.-J. *et al.*, 1993; Avogaro H., Catapano A., 1983; Pulfer M., Murphy R.C., 2003; Audesirik T., Audesirik G., 1999).

Фосфатидилэтаноламин (кефалин) – занимает второе место по распространению и является главным липидным компонентом мембран многих микроорганизмов. Он имеет меньшую «полярную головку», но при этом способен образовывать водородные связи именно с помощью концевой аминогруппы (Calderon R.O., DeVries G.H., 1997).

Фосфатидилсерин (1,2-диацил-*sn*-глицеро-3-фосфо-L-серин) – единственный фосфолипид организма, содержащий остаток аминокислоты. От общего уровня фосфолипидов его уровень составляет менее десяти процентов. Максимальная концентрация фосфатидилсерина выявлена в тканях мозга, но иногда в плазматической мембране его уровень может достигать двадцати процентов (Маев И.В. и др., 2011; Deak G., Muzes G., Lang I. *et al.*, 1990; Gardiner T., 2000; Kinjo J., Hirakawa T., 2003; Ito M., Feng J., 1997).

Фосфатидилинозитол является ключевым элементом мембраны и важнейшим участником метаболических процессов в клетках растений, животных и некоторых видов бактерий. В структуре мембран фосфатидилинозитол локализуется в основном на цитозольной стороне бислоя. Его концентрация наивысшая в тканях мозга, где его содержание достигает десяти процентов от общего количества фосфолипидов, при этом во всех тканях он главный источник арахидоновой кислоты, обязательной для синтеза эйкозаноидов, в том числе простагландинов (Арчаков А.И., Бородин Е.А., 1986; Буеверов А.О. и др., 2008).

Все ткани млекопитающих содержат похожие фосфолипиды в родственном количественном соотношении. Но, фосфолипиды нервной ткани высших животных имеют разницу по ФИ-4-фосфату, относительно фосфолипидов животных, находящихся на более низкой ступени эволюции (Болдана Н.Б. и др., 1986; Gundermann K.-J. *Fd.*, 1993).

Значение фосфолипидов проявляется в обеспечении функционирования и роста всех тканей человека и животных, что обусловлено ролью мембран в обеспечении жизнедеятельности клетки и организма в целом. Вышеобозначенные функции наиболее важны для быстро обновляющихся клеток крови и печени – вследствие их большой метаболической и биосинтетической активности. В этих процессах именно фосфатидилхолин из-за своих поверхностно-активных свойств имеет роль связки между апопротеином и поступившими, либо синтезированными в организме нейтральными липидами. Следовательно, фосфатидилхолин принимает участие и в выработке липопротеиновых частиц, поскольку этот процесс происходит также в эпителиальных клетках кишечника, а фосфатидилхолин и апопротеин «обволакивает» жировые капли, таким образом, обеспечивая наработку поступающих в кровь хиломикронов (Маракулина К.М., 2016; Claria J., Arroyo V., 2003; Scholz H., 2003).

Поверхностно-активные свойства фосфатидилхолина обуславливают его участие, вместе с другими фосфолипидами и желчными кислотами в процессе образования желчи, что обеспечивает экскрецию, в том числе холестерина и его метаболитов. Фосфатидилхолин в клетках мозга является источником холина, который крайне важен для поддержания их оптимального функционирования. В клетках легких фосфатидилхолин играет роль сурфактанта, покрывая поверхность альвеол и препятствуя их слипанию в момент выдоха (Zeisel S.H., 2003; Ahmed H.A., Jazrawi R.P., Goggin P.M., Dormandy J., Northfield T.C., 1995; Veldhuizen R., Possmayer F., 2004).

Аминофосфолипиды, такие как фосфатидилэтаноламин играют важную роль в регуляции в процессах свертывания крови, эндоцитозе, клеточной адгезии и др. (Beveris E.M, Comfurius P., Zwaal R.F., 1983; Tanaka Y., Schroit A.J., 1983; Schlegel R.A., Prendegast T.W., Williamson P., 1985). Важность для клетки и организма мембранных изменений подтверждается многочисленными данными об изменении спектра фосфолипидов в мембранах клеток при различных патологиях. В опытах *in vivo* было установлено восстановление мембран гепатоцитов при помощи питания, содержащего ненасыщенные фосфолипиды. У животных, рацион которых включал растительный фосфатидхолин, снижалось развитие холестаза, вызванного циклоспорином А (Devaux P.F., 1991; McEvoy L., Williamson P., Schlegel R.A., 1986; Clark J.D., Schievella A.R. et al., 1995).

Как показали исследования, наиболее перспективны при нарушении мембран клеток печени фосфолипиды растительного происхождения (соя, хлопчатник), поскольку содержат в значительном количестве линолевую кислоту (Nagase H. et al., 2005; Goonesinghe A. et al., 2005).

Наиболее перспективным направлением фармации является использование фосфолипидов для разработки лекарств целенаправленного действия. Использование липосом и других наночастиц в качестве систем доставки препаратов, а также включение веществ с гепатозащитной активностью, витаминов, антител и др. доказало перспективность этого подхода в терапии многих заболеваний (Томилина С.А., Малявина В.В., Сампиев А.М., 2007; Сейфула Р.Д., 1990 Santini F. et al., 1992).

Таким образом, как показано в ряде работ, использование фосфолипидов способствует восстановлению активности мембранных ферментов, регулированию качеств оптимальной текучести и репарации клеточных мембран, проявлению антиоксидантного действию, снижению наработки коллагена, при повышении активности коллагеназы, а также защите митохондриальных и микросомальных ферментов от повреждения. С учетом многосторонней

фармакологической активности данная группа лекарственных средств может применяться при разнообразных поражениях печени (Винницкая Е.В., Юнусова Ю.М, 2012; Schlegel R.A., Prendegrast T.W., Williamson P., 1985).

#### **2.4 Расторопша пятнистая и ее гепатопротекторные свойства**

Расторопша пятнистая – *Silybum marianum* (L.) Gaertn используется в медицине с давних времен, первое упоминание о ней в литературе отмечено в 1089 г. Латинское родовое название растения – *Silybum* – происходит от греческого слова, которое переводится как «кисточка».

Расторопша пятнистая является травянистым однолетним растением с высотой до полутора метров, иногда может быть низким до тридцати см и очень редко – до десяти см. Встречаются высокорослые экземпляры, которые достигают двух-трех метров высотой. В России это растение получило названия – «пятнистая» или «остропестро» (рис. 3) (Сокольский И., 2006).

Плод расторопши представлен семянкой эллиптической или обратно-яйцевидной формы до восьми мм в длину около двух-четырёх мм в ширину. Семянка имеет хохолок, который может отваливаться в процессе заготовки, поверхность у семянки блестящая, лишенная волосков и устьиц, а кожура обладает пятнистой пигментацией (рис. 4) (Крепкова Л.В., Шкаренков А.А., Сокольская Т.А., 2008; Куркин В.А., 2001; Imai T., Kageyama Y., Tobari J., 1997).



Рис. 3 – Расторопша пятнистая – *Silybum marianum* (L.) Gaertn.



Рис. 4 – Плод-семянка расторопши пятнистой

В России официальным фармакопейным лекарственным растительным средством расторопши пятнистой являются зрелые и высушенные плоды, которые обладают уникальным составом содержащим до 30 % растительного и 0,1 % эфирного масел, белковых соединений – до 0,065 %, дегидродиконифериловый спирт, алкалоиды, сапонины, слизь, жирные кислоты, витамин К, горькие и др. вещества (Сокольская Т.А., 2002; Куркин В.А., 2016; Волоцьева, А.В., 200; Post-White J., Ladas E.J., Kelly K.M., 2007).

В семенах расторопши пятнистой выявлен ряд ценных флавоноидов: тансифолин и флаволигнаны (дегидросилибин, силибин, силихристин, силидианин, 2-3дегидросилибин, 2-3-дегидросилихристин и др.). Но все-таки главные биологически активные вещества плодов расторопши пятнистой – это флавонолигнаны (содержание, которых составляет от 1,5 до 3,0 %). Они объединены в собирательное название – силимарин. Основные составляющие этого комплекса – силибин, или силибинин (его часть составляет 60–70 %), силикристин (20 %), силидианин (10 %) и изосилибин (5 %) (Луценко, С.В. и др., 2006; Wellington K., Jarvis B., 2001; Pradhan S.C., Girish C., 2006).

Флавоноиды широко распространены в растительном мире и присущи, в основном, высшим растениям. Флавоноиды – это метаболиты растений, которые в клетках растений выполняют защитные функции – а именно, проявляют растительную пигментацию, которая обеспечивает защиту растений от

вредного ультрафиолетового излучения. Кроме того, флавоноиды обладают антиоксидантными, противовирусными и антибактериальными свойствами, а также регулируют экспрессию генов и модулируют ферментативные реакции. Было установлено, что биологическое действие обширной группы флавоноидных препаратов зависит от их структуры. Основные химические структуры состоят из двух бензольных колец, связанных тригетероциклических атома углерода в цепи. В окислении этой структуры участвует несколько семей флавоноидов (флавоны, флаваноны, антоцианы, и изофлавононы) (Блинова К.Ф., Яковлева Г.П., 1990; Carducci R., Volpe S., 1996; Ramasamy K., Agarwal K. R., 2008).

Исследование *in vitro* флавоноидов установило, что они являются антиоксидантами, намного мощнее чем витамины С и Е. Изучение свободно-радикального окисления клеток человека *in vitro*, которое было вызвано продуктами термического разложения табака, установило, что виноградный экстракт, содержащий олигопроантоцианидин, имел антиоксидантную активность намного выше в сравнении с витаминами С и Е. Также некоторые флавоноиды из винограда могут восстанавливать окисленную форму витамина С и увеличивать продолжительность его полураспада на 400 % (Георгиевский В.П. и др., 1990; Енгашев С.В. и др., 2014).

Концентрация флаволигнанов в плодах расторопши пятнистой может колебаться от 1,5 до 4 %, в зависимости от хеморасы растения. Всего выделить 2 основные хеморасы: хемораса I – силибининовая и хемораса II – силидианиновая. Хеморасы представляют собой результат определенного ответа растения на переменчивость условий среды произрастания и в зависимости от конкретной хеморассы могут доминировать определенные фармакологические свойства расторопши пятнистой (Быков В.А., Куркин В.А., Запесочная Г.Г. и др., 2000; Губергриц Н.Б. и др., 2012).

Комплекс действующих веществ расторопши (флаволигнанов) известен под общим собирательным названием – силимарин, который выделяется

из всех частей растения, но в плодах его содержание самое высокое. Ведущий компонент этого комплекса – силибин или силибинин. С учетом этого экстракт расторопши пятнистой, в первую очередь, стандартизуют по содержанию именно силибина. В стандартизованных экстрактах должно быть около 70-80 % силибина (Гордиенко А.Д., 1990; Luper S., 1998).

Опыту использования расторопши пятнистой в народной медицине около тысячи лет. Греческий врач и ботаник Диоскорид (40-90 н.э.) был первым, который описал лечебные свойства расторопши. Позже, в 1597 году, Джон Джерард отметил, что расторопша «лучшее средство против меланхолии заболеваний». Растение используют с лечебными целями в виде плодов (можно измельченных в порошок), отвара или настойки. Применяют при комплексной терапии при циррозе, гепатите, токсических поражениях печени, воспалении желчных потоков, желчнокаменной болезни и др.

Расторопша пятнистая в России известна давно, причем плоды расторопши уже входили третье издание Фармакопеи России в 1880 году для использования в качестве желчегонного препарата. Позже расторопша применялась с названием *fructus semen Cardui Marie* при желтухах, удалении желчных камней (Венгеровский А.И. и др., 1987; Потапович А.И., Костюк В.А., 2003; Самигуллина Л.И., Лазарева Д.Н., 2004)

В 1969 году из плодов расторопши пятнистой была экстрагирована группа флавоноидных соединений, которые способны оказывать гепатотропное действие и они были обозначены как силимарин. В дальнейшем из силимарина было выделено и изучено три отдельных изомерных компонента: силибинин, силидианин и силикрестин, которые также имеют фенилхромановую структуру и обладают гепатопротекторной активностью. Силибин представляет концентрацию между 50 % и 70 % экстракта из силимарина, но его низкая растворимость в воде, плохая биодоступность и плохое всасывание в кишечнике снижают эффективность соединения (Георгиевский В.П.,

Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е., 1990; Питкевич Э.С., Лызиков А.Н., Цаприлова С.В., 2008).

В последние годы проводились обширные фитохимические и экспериментально-фармакологические исследования разных препаратов из расторопши пятнистой, а также выделенного из нее комплекса биологически активных веществ – силимарина (Козлов С.В. и др., 2015; Wagner H. et al., 1986).

Гепатопротекторные свойства силимарина – способность защищать печень от неблагоприятных воздействий различного генеза, установлены многочисленными экспериментальными и клиническими работами по всему миру. В основе гепатопротекторного действия силимарина лежат многообразные, но окончательно не установленные механизмы действия, такие как: инактивация свободных радикалов, ингибирование процессов ПОЛ, в том числе противодействие снижению запасов глутатиона, уменьшение образования лейкотриенов в печени из полиненасыщенных жирных кислот, активизация синтеза протеина в гепатоцитах, иммуномодуляция организма и др. (Росихин Д.В., Куркин В.А, Рыжов В.М., 2015; Luper S., 1998; Wellington K., Jarvis B., 2001; Kren V., Walterová D., 2005; Pradhan S.C., Girish C., 2006).

В результате многочисленных исследований было объективно установлено фармакологическое действие препаратов расторопши при лечении хронических холецистопатий и постгепатитном синдроме. Опыты, проведенные на лабораторных животных, которым расторопшу применяли различными способами и в разных дозировках доказали, что защитные свойства расторопши при гепатопатиях обусловлены, в основном, содержащимся в ней силимарином (Сокольская, Т.А. , 2002; Wagner, 1986).

Лечебное действие силимарина обусловлено его значительным противокислительным потенциалом и способностью к стабилизации мембран. Антиоксидантное действие реализуется за счет его взаимодействия со свободными радикалами в печени, с последующей их детоксикацией путем трансформации в другие соединения. Этот механизм останавливает процесс

окисления жиров, в связи, с чем клеточные структуры не разрушаются (Цаприлова С.В., Родионова Р.А., 2008).

В серии монографий ВОЗ по отдельным лекарственным растениям, направленных на предоставление научной информации о безопасности, эффективности и контроле качества широко используемых лекарственных растений, описаны данные многочисленных исследований, которые продемонстрировали способность силимарина, в том числе силибина, вступать в реакции со свободными радикалами, при этом подавлять процессы липопероксидации, что способствует стабилизации структуры и формы клеточной мембраны гепатоцитов (WHO monographs on selected medicinal plants, 2002).

В своих исследованиях S.C. Pradhan, C. Girish (2006) считают, что гепатопротекторные качества силимарина в большей степени обусловлены его качествами к антиоксидантной активности и скавенджера «уборщика» – свободных радикалов. Также, силимарин может непосредственно контактировать со структурами гепатоцитов (инкорпорироваться в мембрану), за счет чего оказывает превентивное воздействие на проявление патологических изменений в липидных фракциях (WHO monographs on selected medicinal plants, 2002; Pradhan S.C., Girish C., 2006).

G. Müzes и соавторами (1990) проводил эксперименты по изучению антиоксидантных свойств силимарина при двойном слепом опыте на пациентах с установленной хронической алкогольной болезнью печени. В результате установлено, что через шесть месяцев терапии с силимарином (при его дозировке 420 мг в сутки) зарегистрировано усиление антиоксидантной защиты организма. Это доказано возрастанием исходно низкой концентрации супероксиддисмутазы в эритроцитах и лимфоцитах, с достоверным повышением уровня SH-групп и ГПР. В группе больных, получавших плацебо, аналогичных изменений в факторах антиоксидантной защиты и перекисного окисления липидов не проявилось (Поспелов В.С., Самородов В.Н., 2008).

Кроме того, силимарин за счет нормализации целостности мембраны гепатоцитов затрудняет вход в клетку различных токсичных веществ. Этот механизм реализуется путем блокирования мест связывания токсинов и ингибирования транспортных протеинов в мембране. Благодаря своей фенольной природе, которая может отдавать электроны и стабилизировать активные формы кислорода силимарин оказывает влияние на внутриклеточный глутатион, который предотвращает липопероксидацию мембран (Рещектаев А.С., 2015; Pradhan S.C., Girish C., 2006).

Силибин, входящий в состав силимарина, характеризуется следующим механизмом действия:

- нормализация жирового обмена в гепатоцитах;
- снижение образования жира, при изменении синтеза жиров в сторону увеличения удельного веса липопротеинов низкой плотности;
- защита структуры внешних и внутренних мембран гепатоцитов, которые, препятствуют проникновению в клетку токсинов;
- способствует сохранению глутатиона с помощью, которого клетки инактивируют различные токсины (алкоголь, ксенобиотики);
- оптимизация построения структурных белков в гепатоцитах, что напрямую способствует регенерации поврежденных клеток (Николаев, С.М., 1992; Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В. и др., 1996).

В работах некоторых исследователей выявлено метаболическое действие флаволигнанов расторопши, а именно увеличение транскрипции и времени синтеза РНК в клетке, стимуляция образования пептидов, эти свойства также обеспечивают процесс регенерации гепатоцитов (Беликов В.В., 1985; Волоцуева А.В., 2004 Vogel G., Tuchweber B., Trost W., Mengers U., 1984).

Эксперименты по изучению антитоксического действия силимарина представлены в обзоре S. Luper (1998) где указано, что силимарин проявил ингибиторную эффективность на систему цитохрома P450 в первую фазу де-

токсикации. Это факт может также служить объяснением гепатопротекторных свойств расторопши при гепатопатиях.

Силибин проявляет высокую антиоксидантную способность, что определяет его гепатопротекторный, противоопухолевый и другие эффекты (Greenlee H., Abascal K., Yarnell E., Ladas E., 2007).

Ряд исследований посвящено изучению молекулярных механизмов силимарина при профилактике рака. Расторопша препятствует экспрессии регуляторов клеточного цикла и белков, принимающих участие в процессе апоптоза (Wellington K., Jarvis B., 2001).

Lee et al. установили, что силибин ингибирует активность митоген-активированной протеинкиназы (МЭК)-1/2 и рибосомальной S6 киназы (РСК)-2 в клетках меланомы. При лечении меланомы силибин ослабляется фосфорилирование внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (ERK)-1/2 и RSK2, которая регулируется киназами MEK1/2. Блокада MEK1/2-ERK1/2-RSK2 силибином приводит к снижению активации ядерного фактора-каппа В (NF- $\kappa$ B), активатора протеина-1, и STAT3. Эти белки являются транскрипционными регуляторами нескольких пролиферативных генов при меланоме. Силибин способен индуцировать клеточный цикл, который ингибирует рост *in vitro* и *in vivo* клеток меланомы. Силимарин подавляет А-индуцированный окислительный стресс из-за ультрафиолетового излучения, который может вызвать повреждения кожи (Li M, 2005; Berkson V.M., 1999; Vogel G., 1982).

Исследование в экспериментальной системе «CCl<sub>4</sub>-индуцированное ПОЛ в микросомах из печени крыс» показало, что силибин и силимарин подавляли рост и синтез ДНК в разных клеточных линиях опухолей человека. А комбинация силибина с дигидрокверцетином снижала в клетках синтез холестерина посредством ингибирования лимитирующей скорости фермента 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы (Corchete P., 2008).

Vogel с соавт. (1984) считают, что гепатопротекторное действие силимарина обусловлено конкуритивными взаимодействиями с рецепторами соответствующих токсинов в мембране клеток печени.

Протективному и терапевтическому эффекту силибина на печень способствует то, что около восьмидесяти процентов его примененной дозы выводится с желчью (Gappelletti M., Caniato R., 1984).

Как отмечают Л.И. Драник и Л.Г. Долганенко (1981), эффективной эвакуации токсинов из печени способствуют флаволигнаны расторопши, которые, помогая синтезу фосфолипидов белка и ДНК, способствуют стабилизации мембран гепатоцитов.

В исследовании на собаках силимарин использовали в дозировке 85 мг/кг массы тела в первые сутки после отравления *Amanita phalloides*. В группе животных, получившей силимарин, гибели не зарегистрировано. А у собак без лечения смертность составила тридцать три процента. Исследование гепатоиндикаторных ферментов и результаты биопсии печени подтвердили гепатопротекторный эффект силимарина (Vogel G. et al., 1984; Luper S., 1998).

Препараты из расторопши пятнистой также могут оказывать противовирусное и противовоспалительное действие. Ядерный фактор «каппа-би» является ключевым регулятором воспаления и иммунных реакций. Силимарин обладает качеством подавлять ДНК-связывающую активность NF-κB и экспрессию специфических генов (Pradhan S.C., Girish C., 2006).

Экспериментами, поставленными на лабораторных крысах, установлено, что инъекционное введение силимарина в малых дозировках обуславливали супрессию Т-лимфоцитов, а когда силимарин применяли в высоких дозах, то это стимулировало воспалительную реакцию (Desplaces A. et al., 1975; Pradhan S.C., Girish C., 2006).

Эксперименты, проведенные S. Luper (1998) и S.C. Pradhan, C. Girish (2006) выявили наличие у силимарина противовоспалительного эффекта, ко-

торое реализуется стабилизацией тучных клеток, при уменьшении миграции нейтрофильных гранулоцитов, подавлении активности клеток Купфера, ингибирования образования лейкотриенов и простагландинов.

К ведущим эффектам силимарина относят его способность активизировать регенерационные процессы в печени за счет оптимизации синтеза протеина, рибосом и ДНК. К интересным данным относят и то, что силимарин активизировал процессы синтеза протеина только в пораженной печени (частичная гепатэктомия), а при незначительной степени повреждения печени стимуляции синтеза протеина, рибосом и ДНК не происходило (Luper S., 1998; Pradhan S.C., Girish C., 2006; Farghali H., Kamenikova H L., Hynie S., 2000).

Следовательно, в настоящее время во многом изученными являются такие эффекты флавоноидов расторопши, как антиоксидантный, антигепатотоксический, противовоспалительный и антиаллергический, антифибротический, стимуляция регенерации ткани печени. Эта фармакологическая полифункциональность объясняет гепатопротекторное действие силимарина, которое находит широкое использование в клинической практике (Староверов С.А., Волков А.А., Козлов С.В. и др., 2016; Schrieber S.J. et al., 2008).

При этом, в последние годы интерес к силимарину значительно увеличился благодаря установлению у него новых свойств: регуляция процессов апоптоза и воспаления, взаимодействие с рецепторами стероидных гормонов, модуляция транспортеров лекарств, нейропротекторная и нейротропная активность, гипохолестеринемическое действие, противораковые, противодиабетические и кардиопротекторные и многие другие свойства (Skottovak N. et al., 1998; Kren V., Walterová D.; 2005; Tamayo C., Diamond S., 2007).

## **2.5 Аминокислоты (метионин): механизм действия при гепатопатиях**

Аминокислоты и их производные давно и эффективно используются в медицине как самостоятельные лекарственные средства или в качестве со-

ставляющих комплексных фармацевтических препаратов. К 1-й группе относятся метионин, цистеин, глицин, таурин, глутамин, триптофан; а ко 2-й – аспаркам, квадевит, декамевит, вицеин, асписол, панангин, гамалон, векопирин, фалкамин (Западнюк, В.И., 1982; Kolstad O. et al., 2001).

В ассортименте этих аминокислот стали появляться искусственные смеси аминокислот с приставкой «гепа» и предназначенные, в первую очередь, для применения в гепатологии. Искусственно в них увеличивается доля разветвленных аминокислот и снижается ароматических (Blackburn G.L., Grant J.P., Yoring V.R., 1983; Дружинина Э.И., 1980).

Метионин (2-амино-4-метилтиобутановая кислота) – незаменимая алифатическая серосодержащая аминокислота.

Метионин как препарат (*Methioninum*; синонимы: *Acimetion*, *Ametionol*, *Athinon*, *Meonine*, *Metione*, *Thiomedon*) представляет собой белый кристаллический, плохо растворимый в воде порошок, с запахом, характерным для меркаптосоединений (запах сероводорода), слегка сладковатый на вкус. Продукты формилирования или ацетилирования метионина (N-формил- и N-ацетил метионин) хорошо растворимы в воде.

Метионин содержит метильную группу, которая участвует в процессе переметилирования и необходима для поддержания роста и азотистого равновесия организма, а также играет значительную роль во внутриклеточном метаболизме. Он является активатором действия гормонов, витаминов (В<sub>12</sub>, аскорбиновой и фолиевой кислот) и ферментов, проявляет липотропное действие, уменьшает концентрацию холестерина в крови, оптимизирует соотношение холестерин: фосфолипиды, а также уменьшает отложение в печени нейтрального жира (Климович И.И. с соавт., 2004).

Живой организм способен усваивать L-метионин и D-метионин, при этом D-метионин трансформируется в L-изомер. А L-метионин является единственным предшественником S-аденозилметионина и донором метильных

групп при реализации реакций трансметилирования для синтеза холина, креатина, адреналина, фосфатидилхолина, полиаминов, гликозаминогликанов.

Метионин принимает участие в обезвреживании ряда токсичных вещества реализуемое путем метилирования, участвует в синтезе серотонина, а также способствует выработке адреналина; необходимого для производства эстрадиола, важного для беременных, укрепления плаценты и уменьшения токсикоза.

В тканях организма (в том числе в печени) метионин может использоваться для синтеза цистеина, который является субстратом для синтеза основного внутриклеточного антиоксиданта глутатиона, который обладает действием нейтрализации свободных радикалов и реактивных метаболитов при биотрансформации ксенобиотиков, хранение и перенос цистеина, обмен тиосульфида. В клетках печени его недостаток ведет к инактивации адеметионинсинтетазы. Важным свойством метионина является то, что он служит предшественником различных тиоловых соединений – таурина, коэнзима А и др. (поскольку таурин также играет значимую роль в обезвреживающей функции печени). Выявлено, что метионин оказывает влияние на обмен оксида азота, уменьшая синтез индуцибельной NO-синтазы, а также изменяя цитокиновый баланс в сторону активизации противовоспалительных цитокинов (Буеверов А.О., 2001; Сторожаков Г.И., Байкова И.Е., 2000).

Было показано, что применение метионина приводит к увеличению продолжительности жизни у грызунов. Предположительно это реализуется через цикл повышенного липолиза, приводящего к уменьшению жировой ткани у старых крыс. Кроме того, исследование показало, что молодые и зрелые животные, склонные к ожирению, на диете с метионином демонстрировали долговременное увеличение расхода энергии и разобщение белка-1 (UCP-1). Это изменение в UCP-1 также сопровождалось снижением лептина и повышением адипонектина, что предполагает ремоделирование жировой ткани под влиянием метионина. В ряде исследований показано, что живот-

ные на диете метионином демонстрируют более низкие показатели продукции митоза и меньшее окислительное повреждение мтДНК как в сердце, так и в печени. Снижение метионина приводит к увеличению числа незаряженных тРНК, которые могут активировать не контролируемую киназу 2 (GCN2), что приводит к метаболической адаптации. Тем не менее, GCN2 может не быть обязательным для ответа, поскольку метаболическая адаптация также может происходить через неканонический PKR-подобный путь киназы эндоплазматического ретикулума (PERK) / NRF2. Эти механизмы важны для метионин-индуцированного интегрированного ответа на стресс, который способствует клеточному гомеостазу и регуляции физиологического ответа организма (Ковалев И.Е., Шипулина Н.В., 2001).

Реакции трансметилирования имеют важное биологическое значение, когда метильная группа в молекуле метионина прочно связана с атомом серы. В результате присоединения к метионину остатка аденозина, освободившегося при гидролизе аденозинтрифосфата при участии фермента метионин (АТФ), аденозилтрансферазы, образуется активная сульфониевая форма аминокислоты S-аденозилметионин (SAM), который называют также «активным метионином».

Адеметионин это природное вещество, эндогенное синтезируемое из метионина и аденозина, впервые было описано в 1952 году итальянцем Кантони (Ланкин К.М., Крылов Ю.Ф., 1981).

В России лекарство на его основе известно как Гептрал. К фармакологическим эффектам аденозилметионина относят – детоксикационный, антиоксидантный, холеретический, холекинетический, антидепрессивный, нейропротективный, регенерирующий. В печени аденозилметионин выступает в качестве необходимого структурного элемента в трех важных биохимических процессах: трансметилирование, транссульфирование и аминопропилирование (рис. 5).

В организме адеметионин являясь коферментом служит переносчиком метильных групп – для более 40 метаболических реакций необходим перенос метильной группы от S- аденозилметионина на такие субстраты, как нуклеиновые кислоты, белки и др. (Оковитый С.В., Суханов Д.С., Романцов М.Г., 2012).

Метаболизм адеметионина входит в так называемый SAM- цикл – первоначально SAM-зависимая метилтрансфераза, образует S-аденозилгомоцистеин, который распадается на гомоцистеин и аденозин. Далее происходит реакция переноса метильной группы от 5-метилтетрагидрофолата, после чего гомоцистеин превращается в метионин. Далее метионин может вновь превратиться в адеметионин и цикл завершается (Новожеева Т.П., 1997).

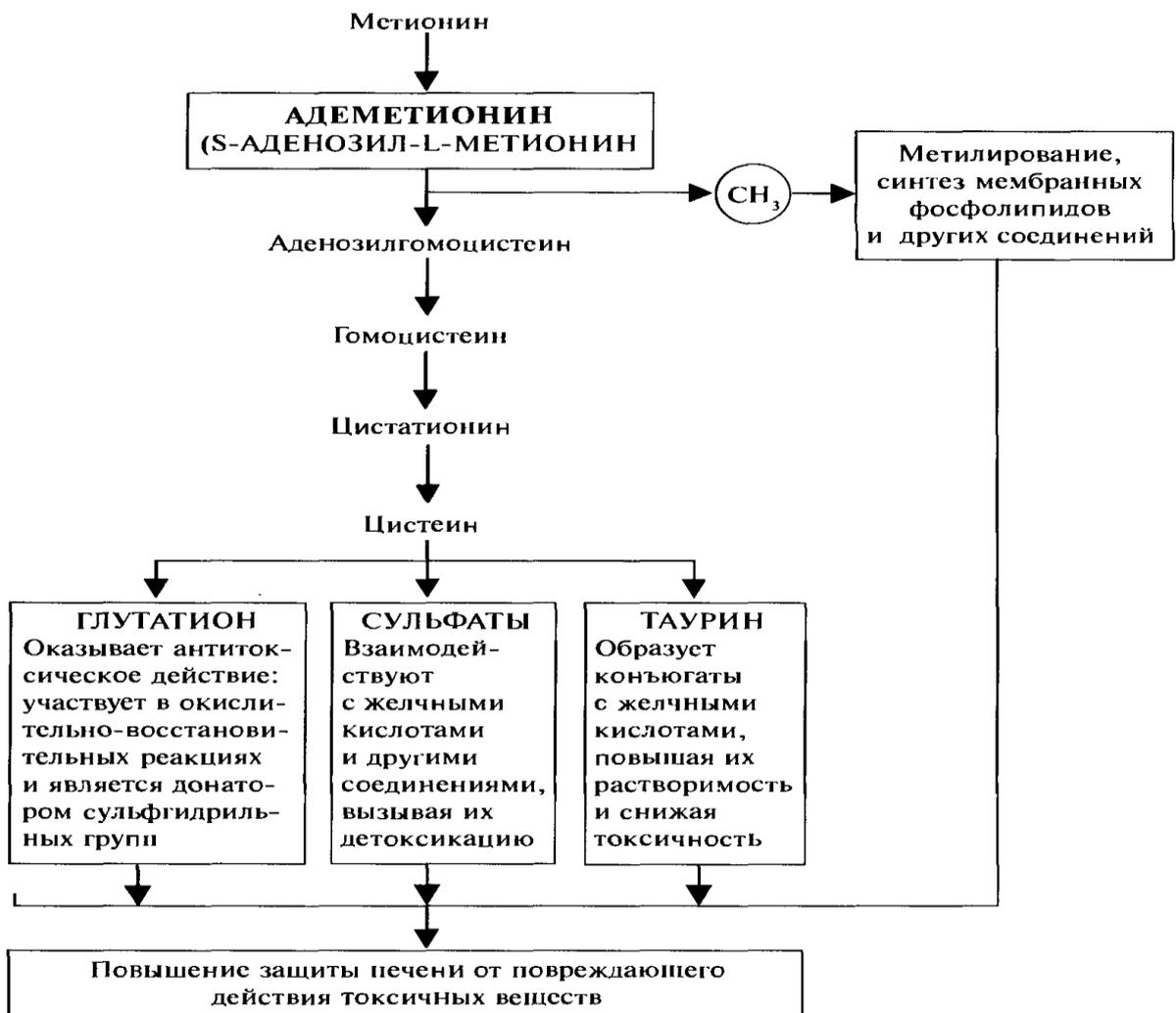


Рис. 5 – Схема гепатопротекторного действия адеметионина

Многочисленными исследованиями установлены антиоксидантные и противотоксические свойства адеметионина, его оптимизирующее влияние на регенерацию печеночной ткани, свойства препятствующие развитию фиброза. Наиболее значимым преимуществом адеметионина является его качество оказывать гепатозащитное действие практически при любой гепатопатологии, при снижении синдромов холестаза и цитолиза (Шумянцева В.В. и др., 1998).

Исследованиями L. Van Zuylen, J. Verweij, A. Sparreboom (2001), было установлено качество адеметионина снижать литогенные свойства желчи, при этом доминирующим критерием служил индекс насыщения желчи холестерином. Максимальную эффективность адеметионин показывает при парентеральном способе введения (Ekins S., Wrighton S.A., 1999).

Если присутствует внутрипеченый холестаз, то происходит снижение активности S-аденозилметил-синтетазы и продукция S-адеметионина, что сопровождается патологическим изменением биохимических процессов в печени. Эти изменения способствуют снижению концентрации фосфолипидов, также снижается активность АТФазы и др. белков, реализующих транспортные функции, снижается текучесть мембраны, конъюгация и выведение компонентов желчи, уменьшаются внутриклеточные запасы тиолов и сульфатов, проявляющих антиоксидантные свойства и имеющих ключевое значение в процессах детоксикации ксеобиотиков. Недостаток этих веществ приводит к развитию цитолиза гепатоцитов. Для пополнения недостатка адеметионина и индукции его синтеза в организме больным с заболеваниями печени назначают синтетические аналоги адеметионина, что изменяет результаты биохимии крови: снижается уровень гепатоиндикаторных ферментов (аминотрансфераз и щелочной фосфатазы), уменьшается концентрация общего и прямого билирубина. Важно, что гепатопротективный эффект сохраняется до трех месяцев после окончания лечения (Уша Б.В. и др., 2008; Оковитый С.В., Суханов Д.С., Романцов М.Г., 2012; Kuzminova E.V., Semenenko M.P. et al., 2019).

К важным качествам метионина относится и то, что он является донатором подвижных метильных групп, обязательным веществом для синтеза холина. Повышение уровня холина способствует возрастанию синтеза эндогенных фосфолипидов, при снижении накопления в печени нейтрального жира. Низкий уровень холина и метионина в организме приводит к развитию жирового перерождения печени (Семененко М.П. и др., 2017).

Метионин и фосфолипиды оказывают синергическое действие друг на друга, также метионинзависимое метилирование фосфолипидов активизирует поляризацию биомембран, что обуславливает непрерывный переход фосфолипидов с внутренней части бислоя мембран на внешний. Этот процесс улучшает текучесть мембран гепатоцитов и оптимизирует регуляцию образования желчи. При нарушении транссульфурирования метионина развивается недостаток глутатиона (пептида являющегося мощным внутриклеточным детоксицирующим фактором). Дефицит глутатиона приводит к низкой резистентности печени к повреждающему действию свободных радикалов и других разных гепатотоксичных воздействий. В момент, когда концентрация новообразованных радикалов превосходит нейтрализующую способность глутатиона, тогда наступает повреждение печени, а свойства метионина способствуют ликвидации недостаточности глутатиона (Журавлева М.В., 2009).

## **2.6 Дигидрокверцетин: биологические свойства**

Важным направлением, активно разрабатываемым в настоящее время, является использование различных природных соединений, обладающих разносторонним спектром действия при этом лишенных ряда недостатков, присущих искусственно синтезированным химическим веществам.

К перспективным природным соединениям можно отнести вещества, выделенные из клеточных стенок лиственницы сибирской (*Larix occidentalis*). Древесина этого дерева содержит до 4,5 % флавоноидов, представленных схожими по химическому строению соединениями, и с доминирующим (бо-

лее 80 %) содержанием биофлавоноида дигидрокверцетина (Роговский В.С., Матюшин А. И., 2010).

Молекулярный скелет флавоноидов состоит из 3 шестичленных колец, два из которых – ароматические, а третье представлено пираноидной природой. Векторным структурным признаком флавоноидных соединений является углеродный скелет С<sub>6</sub>–С<sub>3</sub>–С<sub>6</sub>, включающий конденсированную систему двух колец – бензольного (А) и гетероциклического (С) – и фенильный заместитель (В) в ней (Kurth E.F., Chan F.L., 1953).

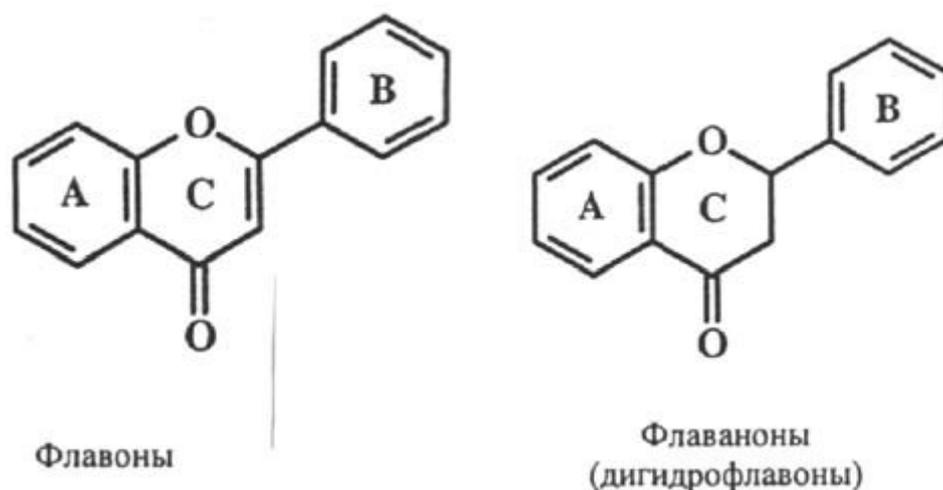


Рис. 6 – Базовые структуры

Первичным классификационным признаком, по которому флавоноиды делятся на группы, является строение кислородсодержащего кольца С – по наличию или отсутствию двойной связи в кольце С (рис. 6).

Флаваноны можно рассматривать как гидрированные производные флавонов. Широко известным представителем флавонов является кверцетин, а дигидрокверцетин относится к группе флаванонов (рис. 7).

Название кверцетин было получено из *кверцетум* (после *Quercus*, то есть, дуб), оно используется с 1857 года.

Дигидрокверцетин (таксифолин, ДКВ) – 2,3-дигидро-3,5,7-тригидрокси-2-(3,4-дигидроксифенил)-4Н-1-бензопиран 4-он является доминирующим компонентом биофлавоноидного комплекса диквертина, технология его получения разработана в 90-е годы в лаборатории химии древесины

ИрИХ СО РАН (Колхир В.К., 1995; Зарубаев В.В., Остроухова Л.А. и др., 2010).

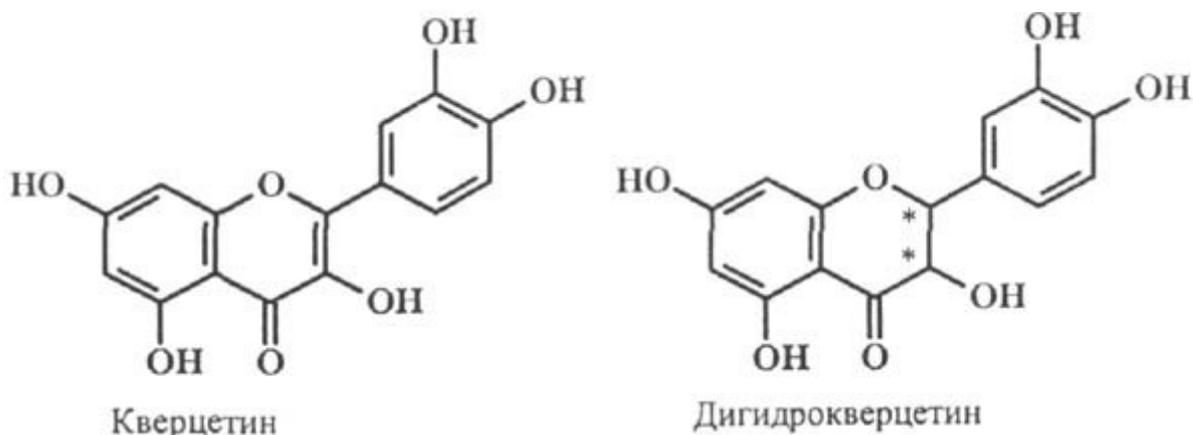


Рис. 7 – Структурные формулы важнейших представителей диквертина

На основе дигидрокверцетина разработано множество биологически активных добавок к пище (свыше 100 наименований, например – Сибларин, Капилар и др.).

Многочисленными исследованиями установлено, что антиоксидантная активность ДКВ превышает способность известных природных антиоксидантов – токоферолов, аскорбиновой кислоты, каротиноидов – в десятки раз, и поэтому его считают эталонным антиоксидантом. В первую очередь, его антиоксидантное действие обусловлено свойством тушить радикалы  $\text{OH}$  и  $\text{O}^2$  (Щукина О.Г. с соавт, 2008; Alberts В., Bray D.et al., 2003, Kuzminova E.V., M.P. Semenenko et al., 2017).

Защитное действие ДКВ на эритроциты, которые были подвергнуты окислительному стрессу, за счет облучения подтверждено. При ишемической болезни сердца доказано качество ДКВ снижать уровень в крови фибриногена, а также интенсивность процессов ПОЛ и деформируемость эритроцитов. Выявлена способность ДКВ активизировать позитивные морфологические проявления в органах у больных при острой гипоксии (Кондакова Н.В., 2002).

Исследованиями О.Г. Кругловой с соавт. (2011), выявлена способность ДКВ в сочетании с витамином Е оптимизировать процессы свободно-радикального окисления липидов у лабораторных животных в условиях холодового воздействия. Недельное охлаждение крыс вело к значительному повышению концентрации продуктов ПОЛ в крови животных. Применение ДКВ внутрь в дозировке 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг массы тела животного и витамина Е – 30 мг/кг достоверно снижало содержания продуктов ПОЛ в крови крыс на 7-й день холодового воздействия. ДКВ в дозе 0,1 мг/кг приводил к более значимому снижению глутатионпероксидазы и диеновых конъюгатов в крови крыс в сравнении с витамином Е.

С.С. Целуйко с соавт (2011), установили, что применение дигидрокверцетина лабораторным животным при длительной гипергликемии снижает дистрофию  $\beta$ -инсулоцитов, приводит к возрастанию в них уровня специфических гранул, в соединительной ткани и стенке кровеносных сосудов минимизируются патологические изменения.

ДКВ может выступать в качестве ингибитора экспрессии белков теплового шока в ответ на гипертермию и др. виды клеточного стресса. Увеличение белков теплового шока может предохранять лабильные белки клетки от процесса агрегации при стрессе. По одним данным, ДКВ может защищать клетки при стрессе, а по другим, – как ингибитор индукции белков теплового шока может снижать адаптивную реакцию в стрессированных клетках. Точное установление этих фактически противоположных эффектов может оказаться важной задачей в перспективе их терапевтического использования (Нифаньев Э.Е. с соавт., 2014).

В отличие от кверцетина ДКВ не подавляет стресс-индуцируемую экспрессию белков теплового шока. Из-за отличий в молекулярной структуре этих соединений можно сделать предположить, что присутствие двойной связи между вторым и третьим углеродами в среднем кольце является необ-

ходимо для проявления ингибирующей активности (Шаманаев А.Ю., Иванов И.С., 2013).

Доказана роль дигидрокверцетина как иммуномодулятора, поскольку ДКВ повышает активацию Т-лимфоцитов, реализуемую за счет стимулирования выработки интерферонов. ДКВ активирует макрофаги, являющимися клетками тревоги иммунного аппарата, также снижает агрессию кислородного взрыва свободных радикалов, все это позволяет организму активно бороться с чужеродными агентами, при этом, не разрушая собственные ткани (Наумов А.А., Шаталин Ю.В., Поцелуева М.М., 2010; Плотников М.Б., Тюкавина Н.А., Плотникова Т.М., 2005).

В исследованиях В.В. Зарубаева с соавт. (2010), противовирусного действия дигидрокверцетина и арабиногалактана на модели экспериментальной летальной гриппозной инфекции были применены вирусы гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) и В/Lee/40. Изучение противовирусных свойств ДКВ выявило, что при гриппе А его противовирусная активность была равна или превосходила таковую у ремантадина.

Изучение эффективности дигидрокверцетина при лечении ожогов проводили в Российском ожоговом центре Нижегородской медицинской академии. Были рассмотрены различные модели ожоговой болезни – с явлениями шока, ожоговой токсемии, септикотоксемии, сепсиса, в периоды подготовки ран к операциям трансплантации аутокожи. У пациентов, которым назначали дигидрокверцетин, предпочтительнее на ранних стадиях ожоговой болезни зарегистрирована позитивная динамика уровня токсемии, стабилизация витальных функций организма, оптимизация биохимических факторов крови, лейкоцитарного индекса интоксикации, ингибирования патологических сдвигов в процессах перекисного окисления липидов. При использовании антиоксидантной терапии у больных клиническая эффективность лечения в отношении местного течения раневого процесса, проявлялся наиболее быстрым

уменьшением отека и воспаления по сравнению с контрольной группой (Игуменьцева В.В., Юшков Г.Г., 2007).

Результаты исследований ГУП ПЭЗ «ВИЛАР» и Московской медицинской академии им. И. М. Сеченова свидетельствуют о том, что дигидрокверцетин тормозит тетрациклин- и тетрахлорметан- индуцированную липидную перекисидацию микросом печени приводящую к интенсивному выходу из поврежденных печеночных клеток трансаминаз (АЛТ АСТ и др.). Вероятно, дигидрокверцетин, предупреждая накопление продуктов ПОЛ, способен индуцировать ферменты монооксигеназной системы печени, в частности, цитохром Р-450 (Игуменьцева В.В., Юшков Г.Г., 2007).

Таким образом, имеющийся опыт использования компонентов препарата эсвелан в качестве гепатопротекторных средств обуславливает актуальность проведения исследований по изучению его активности в области гепатопатологии у животных.

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнялась в 2015 – 2019 гг. в отделе фармакологии Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института – обособленного структурного подразделения ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии». Клинические исследования на собаках проведены в ветеринарных клиниках города-курорта Анапы Краснодарского края и города Советская Гавань Хабаровского края. В период 2016 – 2017 гг. на базе этих клиник было изучалось распространение и структура заболеваний печени у собак (всего обследовано 2100 животных).

Исследования проводились в соответствии с требованиями к врачбно-биологическому эксперименту по подбору аналогов, постановке контроля, соблюдению одинаковых условий кормления и содержания животных в период проведения работы и учета результатов. При постановке опытов использовались клинические, токсикологические, фармакологические, морфологические, биохимические, инструментальные и другие методы исследований.

Объект исследований – препарат эсвелан, содержащий в 1 мл: лецитин (в пересчете на фракцию PPh) – 100 мг; метионин – 30 мг; силимарин (в пересчете на силибинин) – 20 мг; дигидрокверцетин – 2 мг; вспомогательные вещества – остальное.

Стабильность эсвелана определялась по содержанию действующих веществ и других показателей качества препарата, согласно ОФС.1.1.0009.15 «Определение сроков годности лекарственных средств» [129].

Общетоксические свойства эсвелана оценивали путем определения острой и хронической токсичности препарата в соответствии с «Методическими рекомендациями по токсико-экологической оценке лекарственных средств, применяемых в ветеринарии» (1998) и согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», под общей редакцией проф. Р.У. Хабриева (2005), при соблюдении

правил, предусмотренных «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и научной целью» (ETS № 123, Страсбург, 18.03.1986) [49, 113].

При проведении токсикометрии длительность карантина для животных составляла 14 дней, при котором проводился ежедневный осмотр – оценивались поведение, общее состояние, заболеваемость и падеж. На первом этапе исследований животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, распределялись на группы методом ранжирования, при котором в качестве основных критериев использовались возраст, пол и масса тела. Индивидуальные показатели массы тела не отклонялись от среднего значения по группе более чем на 10 %.

В первой серии экспериментов токсикометрические параметры препарата эсвелан определяли в остром опыте при его однократном пероральном введении нелинейным крысам и собакам в дозах от 0,94 г/кг до 15,9 г/кг массы тела.

Во второй серии экспериментов при определении хронической токсичности эсвелана, проведенной на лабораторных крысах использовались 3 дозы препарата – 0,26; 0,65 и 1,3 г/кг массы тела. Режим введения предусматривал однократное ежедневное пероральное применение эсвелана на протяжении 60 дней. При ежедневном осмотре животных оценивалось их общее состояние, сохранность, взвешивание выполнялось в начале опыта, через 30 дней и по его окончанию. В конце исследования у пяти животных из каждой группы проводилось изучение биохимического профиля и комплексный гематологический анализ периферической крови. У этих же крыс после эвтаназии проводили макроскопическое и гистологическое исследование внутренних органов.

Лабораторные исследования крови проводились на автоматическом биохимическом анализаторе «Vitalab Flexor» и на автоматизированном анализаторе «Mythic 18 vet».

Тестирование препарата эсвелан с целью определения его возможного местно-раздражающего действия проводилось на двух видах животных – кроликах с массой тела 3-3,2 кг и морских свинок весом 300-350 г.

В первом опыте для постановки пробы пяти кроликам под верхнее веко правого глаза закладывали эсвелан, левый глаз у кроликов был контрольным и в него закапывали физиологический раствор. После этого веки соединяли и держали в таком положении в течение 1-2 секунд. Реакцию оценивали через 15 минут (быстрая реакция), через 24 и 48 часов (реакция замедленного типа). При офтальмологическом обследовании учитывалось общее состояние слизистой оболочки глаза и век, наличие инъекции сосудов склеры и роговицы, секреция слезы – в баллах по классификации Majda A., Chrusaieleska K. (1973).

Во втором опыте раздражающее действие эсвелана изучалось на морских свинок методом накожных аппликаций. За два дня до начала эксперимента у трех морских свинок выстригалась шерсть на спине, затем по поверхности выстриженного участка равномерно распределяли образец препарата эсвелан в дозах 0,02, 0,05 и 0,10 мл/см<sup>2</sup>. Общая площадь нанесения препарата составляла 5 % от общей поверхности тела. Всех животных содержали в индивидуальных клетках и крепили на шею воротники из пластика, предотвращающие слизывание эсвелана. Реакцию кожи на воздействие препарата оценивали в течение 3 суток после однократного нанесения.

Эмбриотоксическое и тератогенное действие определяли согласно «Методическим указаниям по изучению репродуктивной токсичности фармакологических веществ» [112].

Изучение фармакологической активности эсвелана проведено на лабораторных животных в двух экспериментах – при лекарственно-индуцированном повреждении печени тетрациклином и токсическом повреждении печени CCL<sub>4</sub> в соответствии с «Методическими указаниями по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ» (2005).

В первом опыте экспериментальное поражение печени у животных вызывали внутрижелудочным введением тетрациклина гидрохлорида в виде суспензии с Tween-80 (1:10) в дозе 0,5 г/кг массы тела ежедневно в течение 7 дней. Эксперименты проводили на нелинейных крысах, которых разделили на пять групп по 10 животных в каждой. При затравке крысам первых трех групп за час до применения антибиотика и в последующие 7 дней ежедневно внутрь вводили эсвелан в дозах – 0,1; 0,2 и 0,3 мл/кг массы тела. В четвертой группе были животные с лекарственно-индуцированным поражением печени, без лечения. Пятую группу составляли здоровые интактные крысы [102].

Во втором опыте острое токсическое поражение печени у крыс моделировали однократным внутрибрюшинным введением четыреххлористого углерода в виде 50 %-ного раствора на оливковом масле в дозе 0,4 мл/кг массы тела животного. Крысам первой группы за час до применения  $CCl_4$  и в последующие 30 дней ежедневно *per os* вводили эсвелан в дозе 0,2 мл/кг массы тела животного. Вторая группа после затравки находилась без лечения. Третья группа состояла из здоровых животных, получавших растительное масло в эквиваленте гепатопротектора по аналогичной схеме.

Эффективность гепатозащитного действия эсвелана оценивали по выживаемости крыс, гравиметрическим показателям их массы тела, клиническим признакам, а также степени изменения биохимических факторов крови и показателей перекисного окисления липидов. Оценку системы ПОЛ-АОЗ проводили в соответствии с методическим пособием ВНИВИПФиТ (1997) по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных [114].

Через сутки после завершающего введения эсвелана животных подвергали эвтаназии передозировкой эфира с оценкой макро- и микроструктуры органов. Также проводили определение концентрации МДА в ткани печени экспериментальных животных с помощью спектрофотометрического теста с тиобарбитуровой кислотой.

Изучение эффективности эсвелана при лекарственно-индуцированном поражении печени собак проводилось на фоне длительного применения преднизолона в терапии иммуноопосредованных артритов. Динамическое исследование приводилось в два этапа: изучение состояния печени собак при длительном применении глюкокортикостероидов; разработка подходов к снижению гепатотоксического действия преднизолона у животных с использованием гепатопротекторов. Для формирования групп в течение двухлетнего периода было отобрано 100 собак разных пород и полов с возрастным диапазоном в 5-6 лет и весовой категорией от 19 до 29 кг. В период исследований собакам в группах была подобрана одинаковая программа кормления лечебными кормами. Всем животным проведено несколько курсов лечения преднизолоном (продолжительность курса 30 дней, максимальная суточная доза 0,6 мг на 1 кг массы тела давалась перорально 2 раза в день в течение 3 недель, отмена производилась постепенным снижением дозы до 0,25 мг на 1 кг в течение 10 дней). Кроме того, были назначены хондропротекторы и физиотерапия, при необходимости применялись обезболивающие средства.

На втором этапе исследований отбирали животных с признаками поражения печени, которых разделили на 3 группы по 10 особей в каждой. В первой опытной группе собакам дополнительно к базовому лечению применяли эсвелан – индивидуально внутрь 1 или 2 раза в день (с общей суточной дозой 0,2 мл на 1 кг массы тела) месячными курсами с перерывом в 2 недели. Животные второй опытной группы в качестве гепатопротектора получали гепатотет в дозе 0,1 мл/кг массы тела внутрь за 30 минут до кормления три раза в день в течение 30 дней, также с двухнедельными перерывами. Всего собакам проводилось, в среднем, по 2 курса гепатотропной терапии, что находило отражение в формировании экспериментальных групп методом рандомизации. Третья группа собак была контрольной, в которой длительное лечение преднизолоном проходило без применения гепатопротекторов.

Эксперименты по разработке показаний к применению эсвелана у непродуктивных животных проводили при хроническом гепатозе (по типу жировой дистрофии) у собак. Для исследований методом парных аналогов формировали две группы собак по 20 животных в каждой.

Кровь для лабораторных исследований у собак отбирали три раза – при постановке диагноза, на 21 и 30 сутки опыта.

УЗИ-диагностика проводилась с помощью ветеринарного ультразвукового сканера «Logiq 5 Expert».

Лечение собак включало: диетическое кормление; в первой группе – эсвелан внутрь 1 или 2 раза в день, с общей суточной дозой 0,2 мл на 1 кг массы тела; во второй группе – гепатовет в дозе 0,1 мл/кг массы тела внутрь за 30 минут до кормления три раза в сутки; по показаниям желчегонные препараты.

Полученные в опытах цифровые данные подвергнуты биометрической обработке с помощью программного обеспечения фирмы Mikrosoft®, фирмы CarlZeiss®. Критерий достоверности определяли по таблице Стьюдента.

## 4. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 4.1 Распространение и структура заболеваний печени у собак

В период 2016 – 2017 гг. на базе ветеринарных клиник города-курорта Анапы Краснодарского края и города Советская Гавань Хабаровского края были проведены мониторинговые исследования по изучению распространения и структуры заболеваний печени у собак.

В результате установлено, что в течение года при обращении за ветеринарной помощью в ветеринарную клинику города-курорта Анапы Краснодарского края от общего количества собак ( $n=1060$ ), основной процент приходился на заразные болезни – 48 %, на втором месте регистрировались неинфекционные болезни – 39 %, прочие причины (паразитарные болезни, хирургическая помощь и др.) составили 13 % случаев. Результаты представлены на рисунке 8.



Рис. 8 – Причины обращения собак в ветеринарную клинику города-курорта Анапы Краснодарского края

Анализ данных по ветеринарной клинике города Советская Гавань Хабаровского края выявил, что в течение года при обращении за ветеринарной помощью в клинику от общего количества собак ( $n=1040$ ) основной процент приходился на незаразные болезни – 47 %, на втором месте регистрировались

инфекционные заболевания – 33 %, по прочим причинам обращались в 20 % случаев. Результаты представлены на рисунке 9.

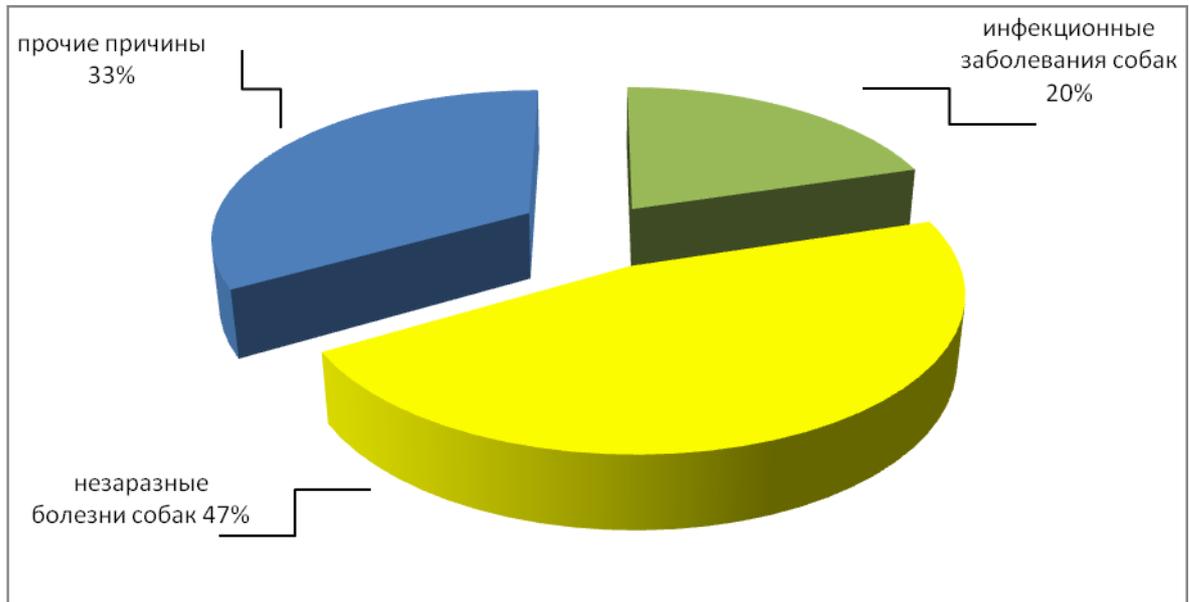


Рис. 9 – Причины обращения собак в ветеринарную клинику города Советская Гавань Хабаровского края

При этом в структуре общей инфекционных заболеваний в ветеринарной клинике города-курорта Анапы Краснодарского края ведущее место занимала чума собак 56 % (Рис. 10).



Рис. 10 – Структура инфекционной патологии у собак по ветеринарной клинике города-курорта Анапы Краснодарского края

В результате проведенного мониторинга, выяснилась что в Анапском районе Краснодарского края гораздо чаще встречаются вирусные заболевания у собак, относительно Советско-Гаванском района Хабаровского края (Рис. 11).

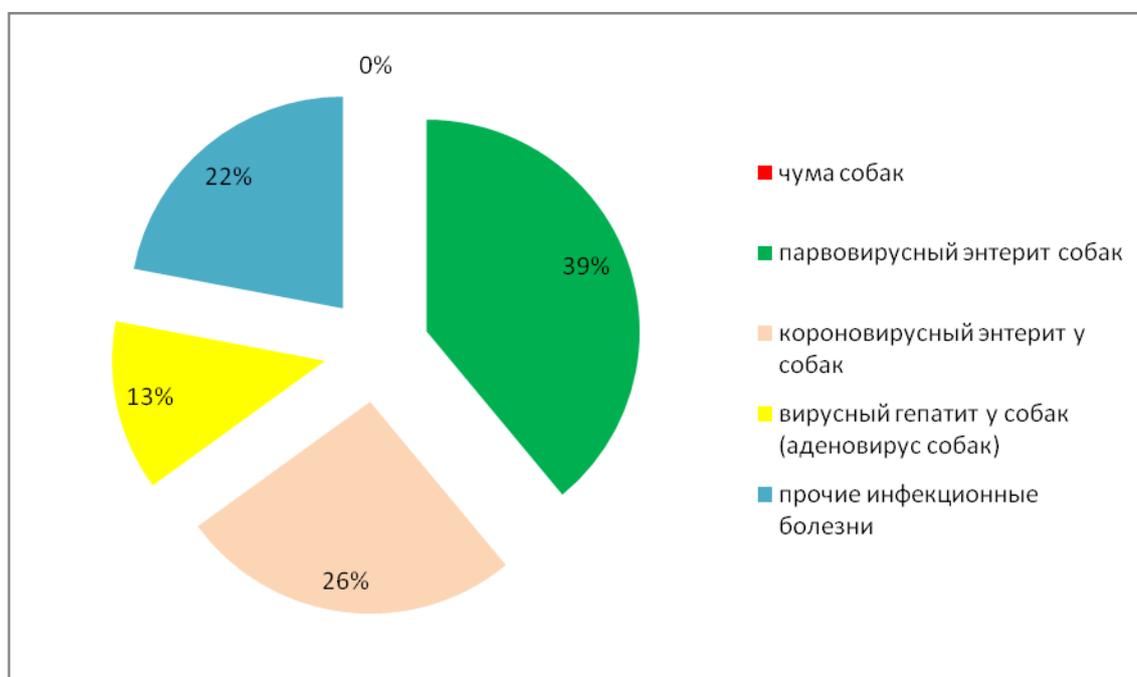


Рис. 11 – Структура инфекционной патологии у собак по ветеринарной клинике города Советская Гавань Хабаровского края

Одним из главных и опасных трансмиссивных заболеваний у собак является пироплазмоз – паразитарное заболевание, при котором заражение происходит при укусе клеща-переносчика. С одной стороны, пироплазмоз собак – заболевание сезонное, но с другой стороны, в результате особых климатических условий Южного федерального округа и города-курорта Анапы Краснодарского края период, в течение которого существует возможность заражения, иногда растягивается на 12 месяцев.

При этом вероятность возникновения бабезиоза в некоторых районах Дальневосточного федерального округа (на примере г. Советская Гавань Хабаровского края) сводятся к нулю. Так, в ветеринарной клинике этого региона за год не было выявлено не одного случая пироплазмоза. В то же время в ветеринарной клинике города-курорта Анапа было зарегистрировано 265 случаев бабезиоза. Основные осложнения и нарушения в организме собак при

пироплазмозе связаны именно с эритроцитами, а точнее с их массовым разрушением, потом разрушенные эритроциты переносятся в печень, и из гемоглобина эритроцитов образуется пигмент билирубин, который способствует развитию гемохроматоза у собак. Применение специфического лечения при поражении бабезиями зачастую сопровождается тяжелыми побочными эффектами, поскольку лекарственные препараты сами по себе токсичны, а организм животного при пироплазмозе значительно ослаблен, что также обуславливает развитие гепатопатии.

Таким образом, различия в структуре инфекционных заболеваний у собак в разных климатических зонах нашли отражение в разнице по развитию гепатопатий у собак. В курортной зоне Черноморского побережья Кавказа выявлено, что значимой долей в патологии печени у собак являются гепатопатии регистрирующиеся при пироплазмозе. Установлено, что тяжелее всего переносят заболевание и имеют сопутствующее поражение печени шарпеи, чау-чау, кавказские и среднеазиатские овчарки. В Хабаровском крае поражения печени, возникающие при заболевании собак чумой минимальны.

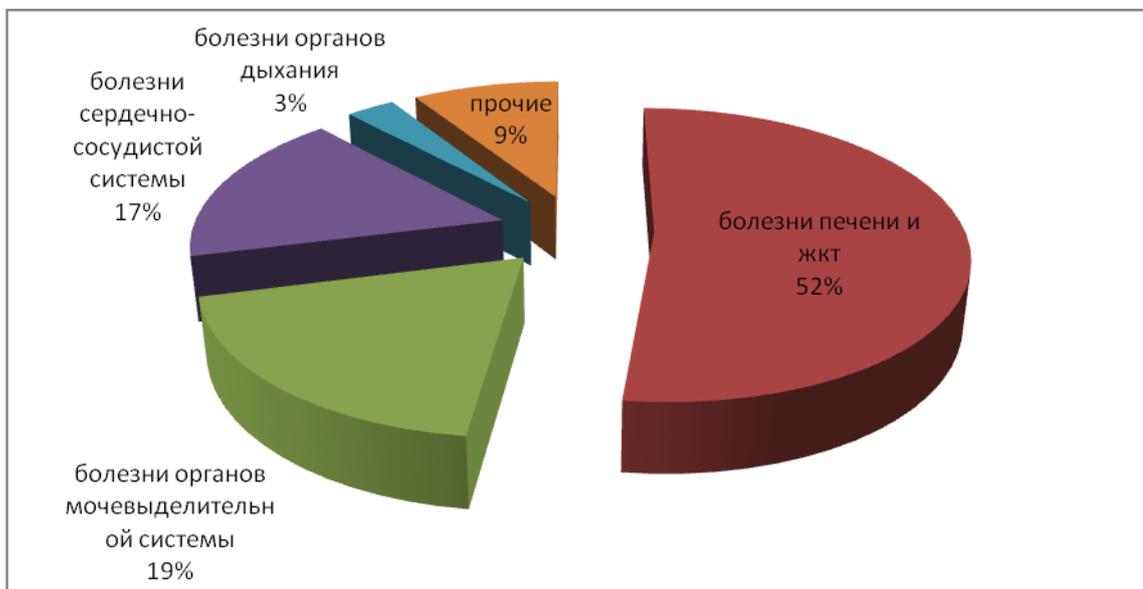


Рис. 12 – Структура незаразной патологии у собак по ветеринарной клинике города-курорта Анапы Краснодарского края

При анализе структуры незаразной патологии у собак установлено, что лидирующее место принадлежит болезням печени и органов пищеварения: по ветеринарной клинике города-курорта Анапы Краснодарского края – 52 % (Рис. 12); по ветеринарной лечебнице города Советская Гавань Хабаровского края – 49 % (Рис. 13).

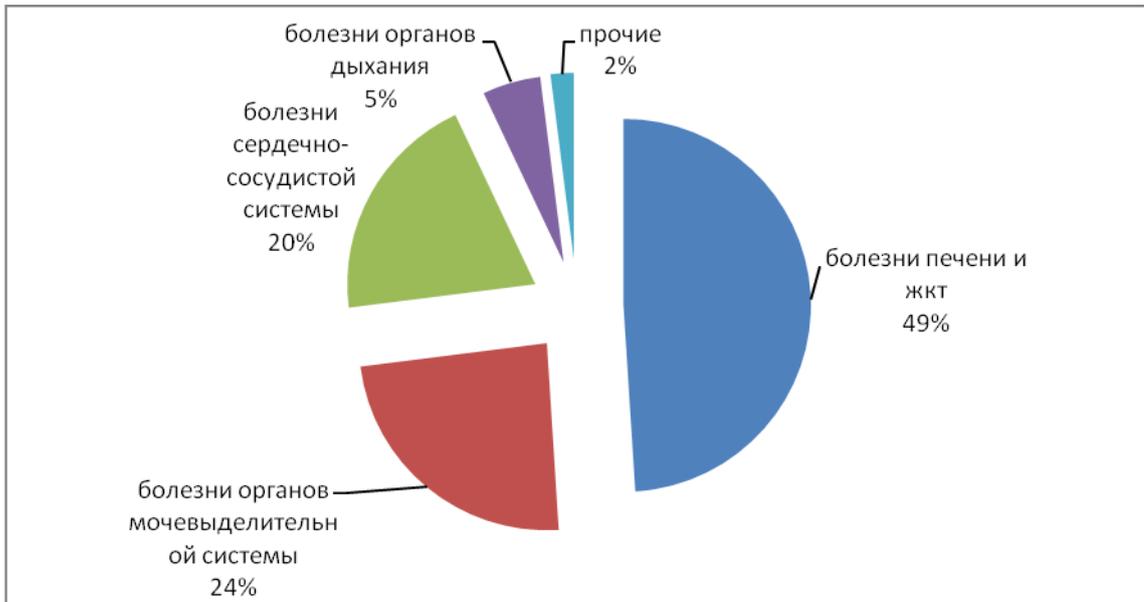


Рис. 13 – Структура незаразной патологии у собак по ветеринарной клинике города Советская Гавань Хабаровского края

В целом, отмечена тенденция к увеличению количества заболеваний печени, при этом многие неопределенные признаки болезней в своей основе имели гепатоз. Дистрофические поражения печени сохраняли лидирующие позиции на протяжении всего периода исследований.

По результатам мониторинговых исследований структура патологии печени у обследованных собак представлена следующим образом:

- по ветеринарной клинике города-курорта Анапы Краснодарского края – гепатозы 54 %, гепатиты – 30 %, очаговые заболевания печени – 4 % и прочие патологии печени – 12 % (Рис. 14);
- по ветеринарной клинике города Советская Гавань Хабаровского края – гепатозы 49 %, гепатиты – 33 %, очаговые заболевания печени – 11 % и прочие патологии печени – 7 % (Рис. 15).

Наиболее часто гепатопатии регистрировались у собак в возрасте от 8 лет и старше, при этом пик заболеваемости приходится на период 9-10 лет.

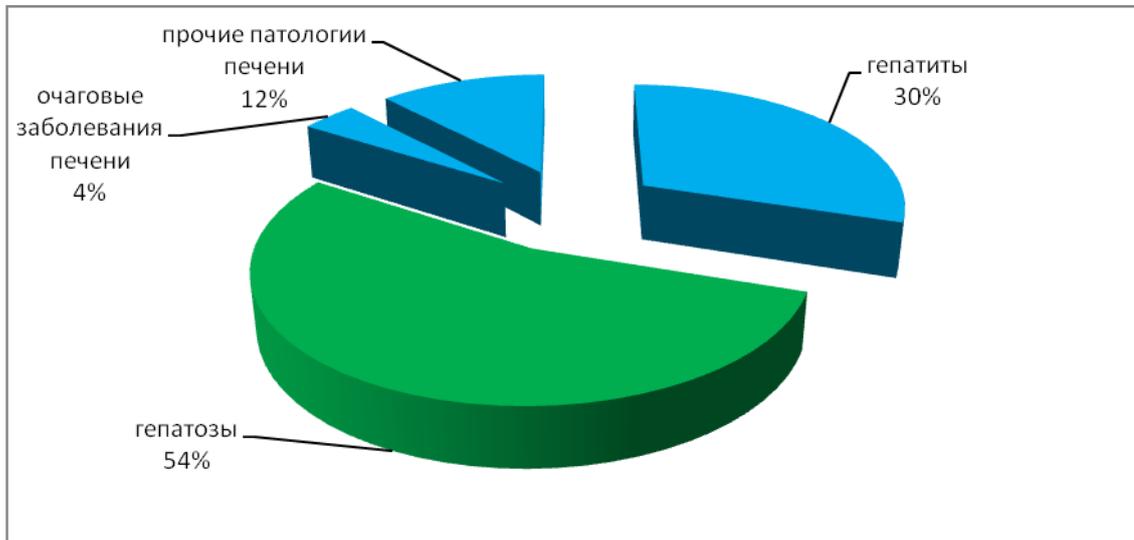


Рис. 14 – Структура патологии печени у собак по ветеринарной клинике города-курорта Анапы Краснодарского края

К очаговым заболеваниям печени, согласно классификации, отнесли опухоли, кисты и абсцессы, обнаруженные по результатам ультразвуковой диагностики брюшной полости. Прочие патологии печени включают в себя болезни сосудов печени, нозологические формы порока положения и формы печени.

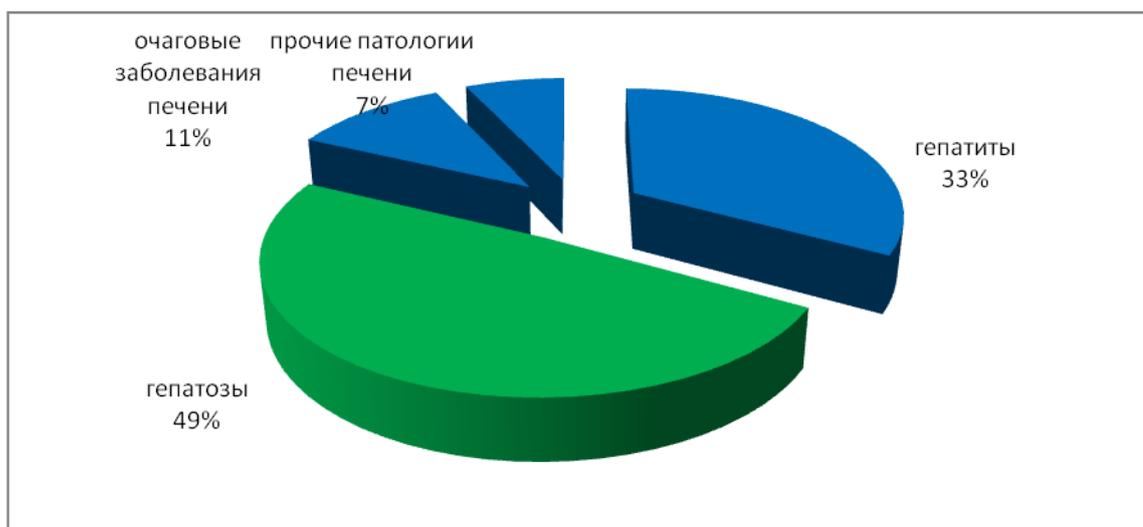


Рис. 15 – Структура патологии печени у собак по ветеринарной клинике города Советская Гавань Хабаровского края

Установлено, что одной из основных причин возникновения патологии печени у собак является неправильно подобранная схема кормления животного. Длительный дисбаланс элементов питания, их дефицит или избыток, нарушение усвояемости в зависимости от наличия отрицательных компонентов рациона, неспособность организма к восприятию поступающих питательных веществ, нарушение пищеварения – приводит к развитию дистрофических процессов в печени. Также распространен инфекционный этиологический фактор, ведущий к развитию печеночной недостаточности: гепатиты вирусной природы (вирусный гепатит, чума, парвовирусный энтерит и др.); реже спирохеты, риккетсии, пироплазмы и др.

При этом результатами собственных исследований подтверждены данные о том, что в современной ветеринарной медицине проблема лекарственной гепатотоксичности приобретает особую значимость, убедительным свидетельством чего является частота регистрируемых побочных эффектов у различных лекарственных средств.

Таким образом, на основе проведенных исследований можно сделать вывод о том, что не зависимо от климатической зоны, отмечена положительная тенденция к увеличению количества заболеваний печени у собак, при этом в структуре гепатопатий основная доля приходится на гепатоз [157, 158].

#### **4.2 Состав, физико-химические свойства и стабильность эсвелана**

В современной ветеринарной фармакологии прогресс характеризуется постоянным поиском и разработкой более эффективных и при этом безопасных лекарственных препаратов.

В состав эсвелана в качестве фармакологически активных ингредиентов были включены:

- эссенциальные фосфолипиды в виде рапсового лецитина, как основной источник экзогенных фосфолипидов, обладающих антиоксидантным и мембранотропным действием;
- метионин – в качестве компонента, способствующего повышению синтеза эндогенных фосфолипидов, потенцирующего гепатопротекторный и детоксикационный эффект других компонентов, а также для улучшения стабильности реологических параметров препарата;
- силимарин – в качестве компонента, обладающего мембраностабилизирующим, антиоксидантным и улучшающим микроциркуляцию тканей печени действием;
- биофлавоноид дигидрокверцетин – в качестве антиоксиданта, который тормозит свободнорадикальное окисление как водорастворимых, так и жирорастворимых субстратов, а также обладает иммуномодулирующей, цитотоксической и противовирусной активностью.

Выбор оптимального состава эсвелана проводили методом биотестирования на модели с *Paramecium caudatum* в отношении антиоксидантной и мембранотропной эффективности комбинаций действующих веществ. Установлено, что все композиции в опытах на парамециях, относятся к высокоактивным мембранотропным и антиоксидантным препаратам. Однако наилучшие результаты достигаются при соотношении лецитина, метионина, силимарина и дигидрокверцетина как – 50:15:10:1. Таким образом, было подобрано оптимальное соотношение компонентов в одной лекарственной форме, что послужило основанием для разработки препарата эсвелан, содержащего в 1 мл: лецитин (в пересчете на фракцию PPh) – 100 мг; метионин – 30 мг; силимарин (в пересчете на силибинин) – 20 мг; дигидрокверцетин – 2 мг; вспомогательные вещества (Na-КМЦ, вода очищенная, спирт этиловый не более 1,0 %) – остальное.

Основой препарата являются лецитины, вырабатываемые из растительных масел – подсолнечных, соевых, рапсовых в соответствии с ГОСТ 32052 –

2013. Предпочтительнее использовать рапсовые лецитины, которые обладают наиболее выраженными фармакологическими свойствами: гепатопротекторными, мембранопротекторными, радиопротекторными, иммуномоделирующими и др. [75, 76, 77].

С учетом этого при разработке эсвелана использовали рапсовые лецитины, полученные по оригинальной технологии в Краснодарском научно-исследовательском институте хранения и переработки сельскохозяйственной продукции – филиале ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия». Состав макро- и микронутриентов, содержащихся в рапсовом лецитине представлен в табл. № 1 и 2.

Таблица 1 – Нутриенты липидной природы рапсового лецитина

Наименование показателя	Значение показателя
Фосфолипиды, г/100 г, в том числе:	60,0-63,3
фосфатидилинозитолы	9,6-10,0
фосфатидилсерины	8,7-9,4
фосфатидилхолины	16,2-17,3
фосфатидилэтаноламины	14,8-15,2
фосфатидные кислоты	9,3-9,6
дифосфатидилглицерины	1,7-2,2
Полиненасыщенные жирные кислоты, г/100 г:	
линоленовая C <sub>18:3</sub> (омега-3)	3,1-3,3
линолевая C <sub>18:2</sub> (омега-6)	15,0-15,2
Соотношение жирных кислот: омега-6: омега-3	5:1

Из данных таблицы 1 видно, что в составе рапсовых лецитинов содержится целый комплекс фосфолипидов, но преобладающей группой являются фосфатидилхолины, которые относятся к наиболее значимым и физиологически активным для организма фосфолипидам (необходимы для строительства и коррекции липидного баланса клеточных мембран, обеспечивают их адекватное функционирование и др.).

Содержание полиненасыщенных жирных кислот ( $\omega$ -6 и  $\omega$ -3), которые являются важным эссенциальным фактором питания, в рапсовых лецитинах

находится в оптимальном соотношении, что важно для регуляции гормонального равновесия организма, адекватного метаболизма жирового и белкового обмена и др.

Таблица 2 – Минерально-витаминный состав рапсового лецитина

Наименование показателя	Значение показателя
Макроэлементы, мг/100г:	
калий	640-650
магний	400-420
кальций	710-720
фосфор	2380-2400
Микроэлементы, мг/100 г:	
железо	5,3-5,5
медь	0,2-0,3
Фитостерины, мг/100 г, в том числе:	
$\beta$ -ситостерол (провитамин Д)	445-450
Токоферолы (витамин Е), мг/100 г, в том числе:	
$\alpha$ -токоферол	14,0-14,5
$\beta$ + $\gamma$ -токоферолы	36,0-38,5
$\delta$ -токоферол	6,0-7,0

При оценке минерально-витаминного состава рапсового лецитина в минеральном спектре максимальная концентрация принадлежит фосфору, а из микроэлементов – доминирует железо. Витаминный состав представлен токоферолами и  $\beta$ -ситостеролом, что обуславливает дополнительные возможности фармакологического действия эсвелана.

Таким образом, основа препарата – рапсовый лецитин, включающий целый спектр веществ, обладающих мембранопротекторным, антиоксидантным и иммуномодулирующим действием, что повышает резистентность клеточных мембран и способствует восстановлению гомеостаза организма, снижению неблагоприятных исходов при заболеваниях, в том числе печени.

При определении содержания фосфолипидов в препарате эсвелан использовалась методика в модификации Томилиной С.А., Малявиной В.В.,

Сампиева А.М. (2006) «Оценка возможности количественного определения фосфатидилхолина в фосфолипидсодержащих препаратах методом инфракрасной спектроскопии аналитического метода определения фосфолипидов – метода инфракрасной спектроскопии (ИК-спектроскопии)» [167].

В состав препарата эсвелана входит дигидрокверцетин (ДКВ), который относится к антиоксидантам натурального происхождения и биофлавоноидам. В работе использовали субстанцию ЗАО «Аметис» с массовой долей дигидрокверцетина 98,6 %. По внешнему виду субстанция представляет собой аморфный порошок белого или белого с желтоватым оттенком цвета.

При определении содержания дигидрокверцетина в эсвелане применялась методика качественной реакции по образованию окрашенного цианидинхлорида из ДКВ, а также его родственных соединений при взаимодействии с цинком в присутствии уксусной и соляной кислот. Образующиеся окрашенные соединения характеризуются максимумом светопоглощения при длине волны 550 нм и определяются методом прямой спектрофотометрии.

Характеристики используемого в препарате эсвелан экстракта расторопши представлены в таблице 3. Количественное определение содержания силимарина в пересчете на силибинин в препарате эсвелан проводили с помощью жидкостной хроматографии.

Таблица 3 – Показатели качества экстракта расторопши

Используемое сырье	Семена расторопши		
Ботаническое название	Silybum marianum		
<b>Параметры</b>	<b>Описание</b>	<b>Метод</b>	<b>Результаты теста</b>
Цвет	Желто-коричневый	Органолептический	Соответствует
Запах	Характерный	Органолептический	Соответствует
Внешний вид	Тонкодисперсный порошок	Органолептический	Соответствует
<b>Аналитическое качество</b>			
Идентификация	Идентичен стандартному образцу	Жидкостная хроматография	Идентичный

Продолжение таблицы			
Содержание силимарина	$\geq 80.0\%$	УФ	82,35%
Ситовый анализ	100% через сито 80 меш	USP36 <786>	Соответствует
Потеря веса при высушивании	$\leq 5.0\%$	Eur.Ph.7.0 [2.8.17]	3,52%
Общее содержание зольных веществ	$\leq 10.0\%$	Eur.Ph.7.0 [2.4.16]	0,09%
Насыпная плотность	30~50 г/100мл	Eur.Ph.7.0 [2.9.34]	35,26 г/100мл
Плотность утряски	60~90 г/100 мл	Eur.Ph.7.0 [2.9.34]	65,44 г/100мл
Содержание тяжелых металлов			
Свинец	$\leq 3,0$ мг/кг	Eur.Ph.7.0<2.2.58>IC P-MS (масс-спектрометрия с индукционной плазмой)	0,0374 мг/кг
Мышьяк	$\leq 2,0$ мг/кг	Eur.Ph.7.0<2.2.58>IC P-MS (масс-спектрометрия с индукционной плазмой)	0,0552 мг/кг
Кадмий	$\leq 1,0$ мг/кг	Eur.Ph.7.0<2.2.58>IC P-MS (масс-спектрометрия)	0,0126 мг/кг
Ртуть	$\leq 0,1$ мг/кг	Eur.Ph.7.0<2.2.58>IC P-MS (масс-спектрометрия с индукционной плазмой)	0,0317 мг/кг
Растворимый остаток	Соответствует Eur.Ph.7,0<5.4	Eur.Ph 7,0<2.4.24>	Соответствует
Остаток пестицидов	Соответствует требованиям Фармакопеи	USP36<561>	Соответствует
Микробиологические показатели			
Чашечный подсчет	$\leq 1000$ КОЕ/г	USP36 <2021>	Соответствует
Дрожжевые и плесневые грибки	$\leq 100$ КОЕ/г	USP36 <2021>	Соответствует
Кишечная палочка	Отсутствует	USP36 <2022>	Соответствует
Сальмонелла	Отсутствует	USP36 <2022>	Соответствует

Количественное определение содержания метионина в препарате эсвелан проводили методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель».

Из вспомогательных веществ в составе нового гепатопротектора использовали очищенную хлопковую Na-КМЦ (производства Наманганского химического завода), соответствующую ГОСТ 5.588-70.

Лекарственная форма препарата эсвелан – гель, однородный по консистенции, коричневого или желто-коричневого цвета.

Различия в физико-химических свойствах (растворимость) активных ингредиентов разрабатываемого перорального препарата предопределили сложную микрогетерогенную систему и технологию геля, содержащего суспензию и эмульсию действующих веществ. С учетом этого, основной задачей при разработке технологии являлось обеспечение однородности дозирования компонентов эсвелана и повышения биодоступности активных веществ.

**Технологический процесс.** Дисперсионной средой в данной лекарственной форме выступает вода очищенная. В качестве гидрофильной основы была выбрана натриевая соль эфира целлюлозы (натрий-КМЦ) и гликолевой кислоты. Натрий-КМЦ предварительно замачивали половинным объемом холодной воды. В оставшийся объем воды загружали взвешенный метионин и растворяли его. Через 60 мин после замачивания натрий-КМЦ в основу добавляли полученный раствор метионина и нагревали до  $65 \pm 5^\circ\text{C}$  до полного растворения при непрерывно работающей мешалке (100 об/мин) реактора в течение 30 минут. Одновременно осуществляли подготовку суспензионной составляющей, методом диспергирования с вспомогательной жидкостью, для обеспечения более тонкого измельчения действующих веществ и предупреждения слипания. Для этого предварительно готовили пульпу ди-гидрокверцетина и силимарина, используя в качестве вспомогательной жидкости 60 %-ный спиртовой раствор в соотношении 1:1. В пульпу порционно,

тремя равными частями, вводили фосфолипидный комплекс, при этом гомогенизировали полупродукт при каждом введении фосфолипидов.

Далее в полученную суспензию вводили при перемешивании гидрофильную составляющую геля, для обеспечения равномерного распределения действующих веществ, гидрогель с метионином вводили так же порционно. Полученный препарат далее передавали на фасовку, упаковку и маркировку.

Эсвелан расфасовывают в полимерные флаконы по 25 мл и 50 мл, герметично укупоренные с навинчивающимися крышками и контролем первого вскрытия. Каждый флакон упакован в картонную коробку в комплекте с инструкцией по применению и шприцом-дозатором.

Фармакологический эффект эсвелана определяется свойствами входящих в него веществ, при этом каждый из компонентов выполняет свою функцию, дополняя и усиливая свойства другого. Так, введение в состав эсвелана метионина, обеспечивает, помимо фармакологического действия аминокислоты, стабильность реологических параметров эмульсии, не допуская ее разделение на фракции (стабильность эмульсии возникает за счет цвиттерийных свойств молекулы аминокислоты). Дополнительно дигидрокверцетин за счет своих антиоксидантных свойств защищает от окисления фосфолипидный компонент эсвелана и обеспечивает структурную устойчивость его липидных составляющих. Важно, что такие эмульсии сохраняют свой качественный состав и фармакологические свойства в широком диапазоне кислотности от 3,0 до 10,0 рН, при этом выдерживает нагревание до 65°С в течение часа.

По физико-химическим свойствам препарат эсвелан должен быть однородной консистенции, от желто-коричневого до коричневого цвета, не иметь прогорклого запаха, а также признаков физической нестабильности (агрегации частиц, фазового расслоения, коагуляции) и соответствовать требованиям и нормам, указанным в таблице 4.

Оценка качества препарата эсвелан проводилась путем подтверждения уровня требований, заложенных в НДТ по содержанию действующих веществ в соответствии с приведенными методиками.

Таблица 4 – Показатели качества эсвелана

Наименование показателей	Норма по НТД
Внешний вид и цвет	Коричневая или желто-коричневая однородная масса – мазеобразной или более плотной консистенции
Запах	Отсутствует или слабый, свойственный рапсовому маслу
<i>Действующие вещества в 1 мл</i>	
Лецитин (в пересчете на фракцию PPh)	100 мг
Метионин	30 мг
Силимарин (в пересчете на силибинин)	20 мг
Дигидрокверцетин	2 мг
Содержание этанола, %	Не более 1
<i>Аналитическое качество</i>	
Кислотное число, мг КОН/г	Не более 4,0
Перекисное число, ммоль активного кислорода/кг	Не более 10,0
pH	6,5
Микробиологическая чистота	Не более $10^3$ бактерий и $10^2$ грибов, при отсутствии патогенной флоры
Безвредность в тест дозе внутрижелудочно на одну мышь, мл	0,5

Из показателей, характеризующих эффективность технологического процесса, классически контролируемых для масел, жиров и других липидных продуктов в показатели качества эсвелана включены определение «Кислотного числа» и «Перекисного числа», при этом величины данных показателей нормируются СанПиН 2.3.2.1078-01 (п. 1.7.3.).

При оценке однородности эсвелана 3 пробы препарата (по 20 мг) размещали на предметном стекле, сверху накрывали другим стеклом, затем

плотно их сжимали до образования пятна диаметром около 2 см. При рассмотрении образцов невооруженным глазом не должно быть включений, а также признаков физической нестабильности.

При определении рН навеску эсвелана растворяли в 30 мл дистиллированной воды с температурой 50-60<sup>0</sup>С, затем проводили встряхивание на вибраторе в течение получаса. Получали вытяжку, которую фильтровали и проводили потенциометрическое титрование по ОФС.1.2.1.0004.15.

Стабильность эсвелана определялась по содержанию действующих веществ и других показателей качества препарата, согласно ОФС.1.1.0009.15 «Определение сроков годности лекарственных средств». Срок хранения эсвелана определяли в естественных условиях посредством мониторинга показателей качества в течение 2 лет через каждые 3 месяца в течение первого года хранения и каждые 6 месяцев в дальнейшем.

В результате проведенных исследований установлено, что в течение 18 месяцев показатели качества препарата находились в пределах параметров НТД и лишь в отдельных сериях по истечению 2 лет были превышены показатели окислительной порчи, что позволило установить срок годности препарата эсвелан 1,5 года со дня изготовления.

### **4.3 Токсикологическая оценка препарата эсвелан**

На этапе доклинических исследований эсвелана были изучены общетоксические свойства разработанного препарата на лабораторных животных (крысах – как релевантный вид, общепринятый для доклинических исследований и кроликах), а также на собаках (основной целевой вид животных) для подтверждения безопасности его применения в ветеринарной практике.

Общетоксические свойства препарата эсвелан оценивали путем определения острой и хронической токсичности в соответствии с «Методическими рекомендациями по токсико-экологической оценке лекарственных средств, применяемых в ветеринарии» (1998) и согласно «Руководству по

экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (2005), при соблюдении правил, предусмотренных «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и научной целью» (ETS № 123, Страсбург, 18.03.1986).

Лабораторные животные содержались в виварии Краснодарского НИВИ, эксперименты на собаках проводились в условиях ветеринарной клиники «Доктор Томас» (город-курорт Анапа).

Животных размещали в клетках с условиями обеспечения: удовлетворение нормальных физиологических и поведенческих потребностей (мочеиспускание, дефекацию, поддержание температуры тела, нормального характера движения и поз); адекватная вентиляция; доступ к пище и воде; возможность свободного наблюдения за животным. Клетки с опытными животными размещались в отдельных помещениях, где температура воздуха поддерживалась в пределах 19-25°C, относительная влажность – 50-70 % (температура и влажность воздуха регистрировались ежедневно). При проведении хронической токсичности самки и самцы содержались отдельно. Длительность карантина для животных составляла 14 дней, при котором проводился ежедневный осмотр – общее состояние, поведение, заболеваемость и смертность. Перед началом исследований животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, распределялись на группы методом ранжирования, при котором в качестве основных критериев использовались возраст, пол и масса тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 10 %.

#### **4.3.1 Острая токсичность**

**Острая токсичность** – негативное воздействие лекарственного средства, проявляющееся после однократного его применения или же повторного введения через короткие интервалы времени в течение одних суток, с целью определения переносимых, токсических и летальных доз.

В первом эксперименте токсические параметры эсвелана определяли в остром опыте при его однократном пероральном введении нелинейным крысам. С этой целью формировались 2 группы по 10 животных с массой тела 220-240 грамм (1 опытная и 2 контрольная). Кормление крыс прекращали за 12 часов до введения образца, поение – за 4 часа до начала эксперимента. Всего срок наблюдения составлял 14 суток.

Для возможности внутрижелудочного введения эсвелан применяли в форме водной эмульсии, приготовленной непосредственно перед введением из расчета 2 мл воды на 3 г препарата, в общем объеме 5 мл на животное (максимально допустимый объем для крыс, имеющих массу тела от 200 до 240 г). При этом средняя испытанная доза эсвелана составляла 13043 мг/кг массы тела. Крысам контрольной группы вводили эквивалентные объемы дистиллированной воды. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Определение острой токсичности эсвелана на лабораторных крысах при внутрижелудочном введении (n=10)

Группы	Доза на животное, мл/г	Количество животных	Из них пало	Клиника интоксикации
Внутрижелудочное введение				
Опыт	5,0/3,0	10	–	Реакция на введение
Контроль	5,0/3,0	10	–	Реакция на введение

Установлено, что в период наблюдений гибели животных не зарегистрировано, различий в поведении и состоянии опытных и контрольных крыс не было.

У крыс, как опытной, так и контрольной групп через 15-20 минут после введения образца наблюдалось усиленное мочеиспускание, связанное с большими объемами вводимой жидкости. В первые 1-2 часа у крыс всех групп отмечалась некоторая заторможенность, вялость и отсутствие аппетита, которое было связано со стрессирующим эффектом процедуры внутрижелудочного введения больших объемов эсвелана. В последующем подвижность и аппетит восстанавливались. Рефлексы, координация движений, физиологиче-

ские параметры сердечного и дыхательного ритмов оставались без изменений.

По шкале изменения активности крыс в остром токсикологическом эксперименте, подопытные животные соответствовали значению «нормальное» (5/+++++). Сходная клиническая картина была отмечена и в контроле.

Второй опыт по определению острой токсичности эсвелана проводили по методике Deishmann и Le Blanc (1943), для чего было использовано 16 беспородных собак в возрасте 3-5 лет с массой тела 10-12 кг, из которых сформировали 2 группы.

В опытной группе эсвелан вводили внутривенно после 12 часовой голодной диеты в дозах от 0,94 г/кг до 15,9 г/кг массы тела (дозировка рассчитывалась индивидуально по весу собаки), пользуясь шкалой интервалов составленной авторами метода (табл. 6). Эсвелан вводили в форме 20 % водной эмульсии, приготовленной непосредственно перед использованием. Группе контрольных животных в тех же объемах вводили физиологический раствор. Максимальные дозы (от 7,1 до 15,9 г/кг массы тела) собакам вводились дробно через короткие интервалы времени в течение 8 часов. Наблюдение проводили через 1, 3, 6, 12 часов после введения эсвелана, а затем дважды в день (утром и вечером) на протяжении 14 дней.

Таблица 6 – Определение острой токсичности эсвелана для собак при внутривенном способе введения (n=8)

№	Масса тела, кг	Доза, г/кг массы тела	Доза, г/животное	Клинический эффект
1	10,3	0,94	9,7	Все собаки выжили, признаков интоксикации не выявлено
2	11,2	1,4	15,7	
3	11,9	2,1	25	
4	12,0	3,2	38,4	
5	10,8	4,7	50,8	
6	10,1	7,1	71,7	
7	11,6	10,6	122,9	
8	11,4	15,9	181,3	

В результате токсикологических исследований установлено, что однократное пероральное введение эсвелана в дозах от 940 до 15900 мг/кг массы тела не вызывало клинической картины токсикоза у собак, гибели животных не отмечалось.

Собаки, которым вводили препарат в диапазоне доз от 7,1 до 15,9 г/кг массы тела стали подходить к поилкам и пить спустя 1,5-2 часа после введения эсвелана, а к кормушкам с пищей через 8-9 часов (возможно, проявились последствия введения большого объема образца). Общее состояние нормализовалось через 2-3 часа, при этом у животных зарегистрировано некоторое увеличение актов дефекации в первые сутки после введения эсвелана, что можно рассматривать в качестве ответной реакции организма на большие объемы введенного лецитина, который в больших дозах оказывал слабительный эффект на желудочно-кишечный тракт собак.

По состоянию шерстного покрова, видимых слизистых оболочек, ритму и частоте дыхания подопытные животные не имели отличий от контрольных за весь период наблюдений. У животных с применением меньших объемов препарата видимой разницы с контрольными собаками не установлено.

Таким образом, результаты опытов по изучению острой токсичности эсвелана свидетельствуют о том, что при его однократном внутривенном введении нелинейным крысам и собакам в диапазоне доз от 940 до 15900 мг/кг массы тела гибели опытных животных не регистрировали. Следовательно, эсвелан в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4 классу опасности – вещества малоопасные.

#### **4.3.2 Хроническая токсичность**

Исследования хронической токсичности эсвелана проведены на 40 нелинейных белых крысах с массой тела в диапазоне от 160 до 165 грамм, раз-

деленных по принципу пар-аналогов на 4 группы по 10 в каждой (три группы – опытные, одна – контрольная).

В эксперименте использовались следующие дозы препарата (расчет производился от максимальной дозы эсвелана в остром опыте для крыс, которая составляла 13 г/кг массы тела):

*1 группа* – 1/10 от LD<sub>50</sub> (установленной в остром опыте) – 1,3 г/кг массы тела;

*2 группа* – 1/20 от LD<sub>50</sub> – 0,65 г/кг массы тела;

*3 группа* – 1/50 от LD<sub>50</sub> – 0,26 г/кг массы тела;

*4 группа* – контроль.

Схема опыта предусматривала однократное ежедневное пероральное применение эсвелана на протяжении 60 дней. Навеску препарата смешивали с зерновой смесью и готовили болусы, при этом осуществлялся обязательный контроль индивидуального потребления образцов подопытными крысами, после чего через 1,5 часа всем животным скармливались корма основного рациона. Контрольная группа состояла из здоровых интактных животных.

При ежедневном осмотре животных оценивалось их общее состояние. Взвешивание выполнялось при постановке опыта, через тридцать дней и по его окончанию. Лабораторные исследования крови проводились в конце опыта у пяти животных из каждой группы. У них же после эвтаназии проводили макроскопическое и гистологическое исследование внутренних органов.

Для гистологических исследований кишечник отбирали в области перехода двенадцатиперстной кишки в тощую, желудок – в области фундальной его части, поджелудочную железу – в центральной части вентральной доли, печень – в области ворот, сердце – в области правого желудочка, легкое – в области правой верхушечной доли, селезенку и почку – на сегментальном разрезе в центральной части.

Материал для проведения исследования отбирался сразу после эвтаназии, затем его фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина. Проводку материала осуществляли общепринятыми в патогистологии методами

(Г.А. Меркулов, 1969). Осуществляли заливку материала в парафин и затем при помощи санного микротомы МС-2 готовили серийные парафиновые срезы толщиной 5-6 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином.

В ходе ежедневного осмотра крыс при изучении длительного влияния препарата эсвелан на организм лабораторных животных клинических симптомов интоксикации не установлено, сохранность была 100 %. Состояние подопытных крыс было удовлетворительным, активность, реакция на внешние раздражители, потребление корма и воды нормальные. Функции органов пищеварения и мочеотделения не нарушены. Видимые слизистые бледно-розового цвета. Имевшие место колебания клинических показателей были несущественными и не выходили из пределов видовых значений нормы.

Влияние препарата на массу тела лабораторных крыс в динамике (в течение двух месяцев) представлено в таблице 7.

Таблица 7 – Динамика массы тела крыс при изучении хронической токсичности эсвелана ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )

Группа, (доза)	Масса тела, г			Прирост, %
	начальная	на 30 день	на 60 день	
1 опытная, (1,3 г/кг)	162,3±1,31	176,6±0,84	192,0±1,14*	18,3
2 опытная, (0,65 г/кг)	165,3±3,17	179,7±3,37	182,0±2,55	16,7
3 опытная, (0,26 г/кг)	160,2±1,96	172,4±2,73	184,4±2,69	15,1
Контроль	163,0±2,15	171,4±2,43	177,9±1,95	14,9

Примечание: \* $p \leq 0,05$  по отношению к контролю

Анализ этих данных показывает, что максимальное увеличение массы тела у животных было отмечено в первой опытной группе, где различие с фоновыми данными составило 18,3 %. Следовательно, установлена четкая зависимость, определяемая как «доза-эффект», когда введение животным наибольшей дозы (1/10 от максимально введенной в остром опыте) в течение длительного времени привело к наибольшему приросту массы тела. В других

группах в конце опыта масса тела составила: 2 группа –  $182,0 \pm 2,55$  г; 3 группа –  $184,4 \pm 2,69$  г; контроль –  $177,9 \pm 1,95$  г. В процентном выражении различия между опытными крысами и их контрольными аналогами составили не более 2 %.

Возможное токсическое влияние препарата эсвелан на организм животных в хроническом опыте оценивали при лабораторных исследованиях периферической крови крыс, участвующих в эксперименте (табл. 8).

В результате проведенного анализа выявлено, что все показатели соответствовали параметрам нормы. Разница с контролем отмечена только в содержании эозинофилов в первой и во второй опытных группах (в первой  $4,2 \pm 0,36$  %, во второй  $3,9 \pm 0,28$  %, против  $2,8 \pm 0,21$  % у интактных животных). В третьей группе значимой разницы не выявлено. Таким образом, применение препарата эсвелан в токсических дозах ( $1/10$  и  $1/20$  от максимально введенной в остром эксперименте) вызывает незначительные эозинофильные сдвиги в лейкоформуле, что является возможной ответной аллергической реакцией здорового организма на введение больших объемов компонентов образца.

Таблица 8 – Влияние препарата эсвелан на показатели периферической крови крыс в хроническом опыте ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Показатели	Группы			
	1 опытная	2 опытная	3 опытная	Контроль
Тромбоциты, $10^9$ /л	$311,5 \pm 9,2$	$318,1 \pm 5,6$	$317,5 \pm 6,3$	$299,5 \pm 8,4$
Эритроциты, $10^{12}$ /л	$8,3 \pm 0,16$	$8,5 \pm 0,07$	$7,9 \pm 0,13$	$8,8 \pm 0,14$
Гемоглобин, г/л	$136,5 \pm 5,8$	$139,4 \pm 7,4$	$135,9 \pm 5,1$	$131,3 \pm 3,9$
Лейкоциты, $10^9$ /л	$10,9 \pm 0,19$	$10,2 \pm 0,21$	$9,3 \pm 0,16$	$10,5 \pm 0,09$
Лейкоформула, %:				
эозинофилы	$4,2 \pm 0,36^*$	$3,9 \pm 0,28^*$	$2,1 \pm 0,14$	$2,8 \pm 0,21$
палочкоядерные	$2,7 \pm 0,03$	$2,2 \pm 0,06$	$1,8 \pm 0,12$	$2,3 \pm 0,06$
сегментоядерные	$22,6 \pm 0,36$	$26,3 \pm 0,34$	$29,4 \pm 0,28$	$27,5 \pm 0,22$
лимфоциты	$68,4 \pm 1,4$	$65,3 \pm 1,9$	$63,9 \pm 1,3$	$64,8 \pm 1,8$
моноциты	$2,1 \pm 0,15$	$2,3 \pm 0,09$	$2,8 \pm 0,11$	$2,6 \pm 0,17$

Примечание:  $*p \leq 0,05$  по отношению к контролю

Биохимическими исследованиями сыворотки крови (табл. 9) установлено, что длительное применение крысам эсвелана в токсичных дозах оказало влияние на протеиновый обмен, так как концентрация общего белка была больше данных контроля в 1 группе на 10,4 % ( $p \leq 0,05$ ), во 2 на 8 % и в 3 на 4 %. В уровне мочевины в первой и второй опытных группах зарегистрировано достоверное увеличение этого метаболита – на 15,5 % и 12,1 % в сравнении с контролем. В третьей группе ее содержание возросло на уровне тенденции, и разница составила 5,2 %.

Во всех опытных группах выявлено увеличение ряда показателей липидного обмена с максимальной разницей в группе, получавшей эсвелан в дозе 1,3 г/кг массы тела. Разница в сравнении с контрольными крысами составила:

- по холестерину на 14,3 %, 7,9 % и 6,4 % соответственно по группам;
- по триглицеридам на 21,9 %, 10,2 % и 3,1 %.

Таблица 9 – Влияние эсвелана на биохимические показатели крови крыс в хроническом опыте ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Показатели	Группы			
	1 опытная	2 опытная	3 опытная	Контроль
Триглицериды, мМ/л	<b>1,56±0,14*</b>	<b>1,41±0,19*</b>	1,32±0,08	1,28±0,17
Холестерин, мМ/л	<b>1,44±0,26*</b>	1,36±0,38	1,34±0,19	1,26±0,35
Общий белок, г/л	<b>71,2±2,4*</b>	69,7±1,9	67,1±2,3	64,5±1,8
Мочевина, мМ/л	<b>6,7±0,32*</b>	<b>6,5±0,41*</b>	6,1±0,29	5,8±0,50
Креатинин, мМ/л	71,8±1,26	72,7±3,71	72,5±2,95	69,8±3,57
Глюкоза, мМ/л	8,56±0,42	8,94±0,34	9,28±0,68	9,12±0,37
Кальций общий, мМ/л	2,5±0,05	2,4±0,03	2,5±0,01	2,3±0,03
Фосфор неорг., мМ/л	2,28±0,11	2,34±0,13	2,58±0,07	2,12±0,09
АлАТ, Ед/л	33,6±1,69	31,2±1,87	28,6±0,95	30,2±1,74
АсАТ, Ед/л	94,8±4,63	89,8±6,32	98,6±6,16	91,4±2,51
Об. билирубин, мкМ/л	7,7±0,35	8,06±0,41	7,98±0,11	7,36±0,20
Пр. билирубин, мкМ/л	2,1±0,12	2,4±0,11	2,3±0,12	2,4±0,19

Степень достоверности: \* –  $p \leq 0,05$  по отношению к контролю

При этом среднее значение всех этих метаболитов в крови крыс не выходило за верхние границы нормы для данного вида животных. Возможно, выявленные сдвиги в биохимической картине крови проявились в результате влияния на организм животных лецитинового компонента препарата, характерным эффектом применения которого является активация липидного обмена за счет увеличения поступления жиров в организм крыс.

При оценке других биохимических показателей крови установлено, что длительное применение образца препарата эсвелан в условно-токсических дозах не вызывало значимых изменений в их уровне, которые отличались от контроля несущественно и находились в пределах видовых норм .

Для регистрации поведенческих реакций животных при определении хронической токсичности эсвелана использовались некоторые показатели динамической и статической активности животных, которые определялись методом «Открытое поле» по завершении эксперимента. Для этого через день после заключительного введения эсвелана по пять крыс из каждой группы индивидуально помещали в камеру, где проводили тестирование. После размещения животных в центре площадки «Открытого поля» засекали время их выхода из центрального квадрата – это показатель горизонтальной двигательной активности, а также количество вертикальных стоек на задние лапы за три минуты – это показатель вертикальной двигательной активности. При наблюдении за поведением лабораторных животных в тесте «Открытое поле» у крыс опытных групп, в сравнении с контрольной группой, достоверных изменений в поведенческих реакциях не зарегистрировано.

Лабораторные крысы, используемые в экспериментах по изучению хронической токсичности препарата эсвелан – по пять из каждой группы, в конце опыта были подвергнуты полной некропсии с оценкой поверхности тела, всех проходов, черепной, грудной, брюшной полостей и их содержимого.

При патологоанатомическом исследовании крыс, длительно получавших эсвелан, макроскопических изменений и патологии в органах не выявле-

но. Шерстный покров был без очагов облысения, блестящий. Кожа нормальной окраски не имела признаков раздражения. При осмотре грудной и брюшной полостей нарушений в расположении внутренних органов не отмечалось. Видимые лимфатические узлы были овальной или округлой формы умеренной плотности, цвет – однородный, розоватый или желтоватый. Щитовидная железа розовато-красноватого цвета имела нормальные размеры и плотность. У тимуса определена треугольная форма, цвет – беловатый, консистенция – умеренно плотная. Желудок обычной формы и размеров, его слизистая бледно-розовая, блестящая, складчатая. Слизистая тонкой и толстой кишки была блестящая и гладкая. Размеры и конфигурация печени не изменены, цвет красно-коричневатый, консистенция – умеренно плотная, капсула – тонкая, прозрачная. Сердце без изменений, цвет коричневатый, консистенция плотная. Легкие бледно-розовой окраски, слизистая оболочка бронхов была гладкой, блестящей, бледно-розовой. Почки не отличались от контроля, их поверхность была гладкой, однородной коричневато-серовой окраски, капсула легко снималась. На разрезе почек отчетливо различались корковое и мозговое вещество. Селезенка имела темно-вишневый цвет, гладкую поверхность и плотноватую консистенцию. Оболочки головного мозга были тонкими, прозрачными. Вещество головного мозга имело умеренную плотность. Расширения желудочков мозга не наблюдалось.

Гистологическое исследование органов и тканей не выявило существенной патологии у животных всех групп.

В таблице 10 представлены данные по массе органов у крыс при изучении хронической токсичности эсвелана в конце опыта. В результате установлено, что колебания массы внутренних органов не были закономерны и не существенны, что свидетельствует об отсутствии токсической нагрузки на органы при длительном применении препарата эсвелан.

Таблица 10 – Масса внутренних органов у белых крыс при изучении хронической токсичности эсвелана, г ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Органы	Группа			
	1	2	3	Контроль
Сердце	0,58±0,01	0,56±0,02	0,52±0,03	0,57±0,04
Легкие с трахеей	1,27±0,06	1,26±0,04	1,22±0,01	1,25±0,05
Печень	6,56±0,09	6,63±0,12	6,49±0,25	6,54±0,13
Селезенка	0,59±0,02	0,56±0,04	0,63±0,07	0,62±0,05
Почки	1,09±0,03	1,10±0,08	1,04±0,05	1,02±0,09
Желудок	1,66±0,04	1,61±0,02	1,60±0,06	1,64±0,6

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют об отсутствии дополнительной нагрузки на органы и ткани при длительном применении эсвелана в токсичных дозах и о его хорошей переносимости лабораторными животными [154].

#### 4.3.3 Местно-раздражающее действие

Тестирование препарата эсвелан с целью определения его возможного местно-раздражающего действия проводилось на двух видах животных: кроликах с массой тела 3-3,2 кг и морских свинок весом 300-350 г. В опыт были отобраны здоровые животные с чистыми кожными покровами. Подбор животных в группу проводили, используя в качестве критерия массу тела. Индивидуальные значения массы тела не отклонялись от среднего значения в группе более чем на 20 %.

Для постановки пробы пяти кроликам под верхнее веко правого глаза закладывали эсвелан, левый глаз был контрольным и в него закапывали физиологический раствор. После инстилляции веки соединяли и держали в таком положении в течение 1-2 секунд.

Реакцию оценивали через 15 минут (быстрая реакция), через 24 и 48 часов (реакция замедленного типа). При офтальмологическом обследовании учитывалось общее состояние слизистой оболочки глаза и век, наличие инъ-

екции сосудов склеры и роговицы, секреция слезы – в баллах по классификации А. Majda, К. Chrusaieleska (1973). Оценки степени повреждения глаза суммировались по всем показателям, после чего вычислялся средний суммарный балл для данной группы экспериментальных животных (табл. 11).

В результате выявлено, что при воздействии эсвелана на конъюнктиву кроликов через 2-3 минуты животные начали проявлять кратковременное беспокойство, проявляя попытки расчесать глаз с препаратом. Последующими наблюдениями не установлено нарушений в клиническом состоянии кроликов (температура тела, пульс и количество дыхательных движений), но у 4 кроликов из 5 развивалась слабая гиперемия конъюнктивы – без выделений, которая исчезала примерно через сутки. Суммарный балл раздражающего действия составил до 1 – слабая выраженность раздражающего действия.

Таблица 11 – Оценка раздражающего действия эсвелана конъюнктивальной пробой (n=5)

Реакция	Баллы	Эффект
<i>А. Гиперемия конъюнктивы и роговицы:</i>		
Сосуды инъецированы	1	0,8
Отдельные сосуды трудно различимы	2	-
Диффузное глубокое покраснение	3	-
<i>Б. Отек век:</i>		
Слабый отек	1	-
Выраженный отек с частичным выворачиванием век	2	-
В результате отека глаз закрыт на <u>половину</u>	3	-
В результате отека глаз закрыт более чем <u>на половину</u>	4	-
<i>В. Выделение:</i>		
Минимальное количество в углу глаза	1	-
Количество выделений увлажняет веки	2	-
Количество выделений увлажняет веки и окружающую кожу	3	-



Рис. 16 – Влияние эсвелана на конъюнктиву кролика

Последующее наблюдение в течение 7 дней не выявило значимых изменений у животных: роговица оставалась чистой; конъюнктивит не развивался; выделения отсутствовали (рис. 16).

Во второй серии раздражающее действие эсвелана изучалось на морских свинках методом накожных аппликаций. За два дня до начала эксперимента у трех морских свинок аккуратно выстригали шерсть на спине, затем равномерно распределяли образец препарата эсвелан по поверхности выстриженного участка в дозах 0,02, 0,05 и 0,10 мл/см<sup>2</sup>. Общая площадь нанесения препарата составляла 5 % от общей поверхности тела.

Всех животных содержали в индивидуальных клетках и крепили на шею воротники из пластика, предотвращающие слизывание препарата. Реакцию кожи на воздействие препарата оценивали в течение 3 суток после однократного нанесения по классификации, представленной в таблице 12.

В результате опытов установлено, что у животных в период наблюдений патологических изменений на коже не отмечались, при этом эластичность, подвижность и упругость кожи морских свинок оставалась неизменной. При пальпации места аппликации болевая реакция не отмечалась. Отека кожи, трещин, корок и геморрагий не установлено.

Таблица 12 – Классификация раздражающего действия препарата на кожу

Классы	Средний суммарный балл выраженности эритемы и отека	Выраженность раздражающего действия
0	0	Отсутствие раздражающего действия
1	0,1-2,0	Слабораздражающее действие
2	2,1-4,0	Умеренно раздражающее действие
3	4,1-6,0	Выраженное раздражающее действие
4	6,1-8,0	Резко выраженное раздражающее действие
Классификация эритемы кожи кролика		
Интенсивность эритемы визуально		Оценка в баллах
1. Отсутствие эритемы		0
2. Слабая, едва заметная		1
3. Умеренно выраженная		2
4. Выраженная		3
5. Резко выраженная		4
Интенсивность отека/толщина кожной складки, мм		
Отсутствие отека		0
Слабая интенсивность до 0,5 мм		1
Умеренная 0,6 – 1,0 мм		2
Выраженная 1,1 – 2,0 мм		3
Резко выраженная 2,0 мм и более		4

На основании полученных данных ответную реакцию оценивали как отрицательную. Таким образом, установлено, что препарат эсвелан не проявляет местного раздражающего действия.

#### 4.3.4 Изучение эмбриотоксических и тератогенных свойств

Эмбриотоксичность – это потенциальная возможность вещества оказывать негативное воздействие на потомство во время начального периода беременности, т.е. в период между зачатием и образованием эмбриона.

Тератоген (teratos – урод) – вещество, при воздействии которого на организм во время беременности возникают пороки развития и (или) отклонения в постнатальном развитии у потомства. Любые нарушения роста, веса, выживаемости, а также отклонения в эмбриогенезе следует рассматривать как аномалии развития, которые могут быть общими, локальными, функци-

ональными и определяют тератогенный эффект изучаемого вещества (*Англо-русский глоссарий избранных терминов по профилактической токсикологии. Москва, 1981, Программа ООН по окружающей среде ЮНЕП*).

С целью изучения влияния препарата эсвелан на организм беременных самок и их потомства проведено исследование его эмбриотоксических и тератогенных свойств. В качестве экспериментальной модели были выбраны нелинейные крысы из-за их высокой плодовитости и короткого периода беременности. В эксперимент отбирали клинически здоровых половозрелых животных, с массой тела 195-220 г. из которых формировали 3 группы по 10 животных в каждой (2 опытных и 3 контрольная). Спаривание проводили, подсаживая самцов к самкам при их соотношении 1:3. Первый день беременности выявляли на основании обнаружения у нормально циклирующих самок сперматозоидов в вагинальном мазке.

Если обнаруживали сперматозоиды, то проводили маркировку крысы, потом помещали ее в отдельную клетку и начинали отсчет срока беременности. С первого по девятнадцатый день беременности крысам 1 и 2 опытных групп один раз в сутки вводили *per os* эсвелан в дозах – 1/20 от максимальной введенной в остром опыте (0,65 г/кг массы тела) и условно-терапевтическую (0,2 мл/кг массы тела). Животным 3 контрольной группы вводили внутривенно растительное масло в эквивалентном объеме 1 опытной группы.

На 21 день беременности крыс подвергали эвтаназии для последующих исследований согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных». Возможное токсическое действие эсвелана на развитие эмбрионов исследовали при патоморфологическом вскрытии, при котором регистрировали следующие показатели: количество желтых тел беременности, места имплантации, масса эмбрионов, кранио-каудальный размер плодов, количество живых и погибших эмбрионов, внешние аномалии развития, число и локализацию гематом. Показателями эмбриотоксично-

сти при оценке нового лекарственного средства служат: пред- и постимплантационная эмбриональная смертность, морфологические (анатомические) пороки развития, а так же общая задержка развития плодов. На основании полученных данных рассчитывали предимплантационную и постимплантационную смертность плодов, суммарную массу плаценты и плодов у каждой беременной самки, количество подкожных кровоизлияний согласно «Методическим рекомендациям по доклиническому изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств (2009) [112].

Предимплантационную смертность рассчитывали по разности между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантации в матке. Постимплантационную смертность – по разности между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов. При оценке тератогенного действия эсвелана подсчитывали количество плодов с аномалиями, заметными при внешнем осмотре, которое проводили с помощью лупы от головы к хвосту, а затем исследовали состояние внутренних органов и скелета. Также, плоды взвешивали и определяли их краниокаудальный размер.

Таблица 13 – Оценка эмбриотоксических и тератогенных свойств препарата эсвелан ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )

Показатель	Группа		
	1 опыт	2 опыт	3 контроль
Количество желтых тел беременности на 1 самку	16,1±0,9	16,8±0,6	15,4±0,2
Предимплантационная гибель, %	12,6	11,9	12,8
Количество живых эмбрионов, ед	10,2±0,1	9,8±0,5	10,4±0,3
Постимплантационная гибель, %	2,9	2,8	3,0
Общая эмбриональная смертность, %	15,5	14,7	15,8
Масса эмбрионов, г	3,5±0,1	3,3±0,5	3,4±0,6
Краниокаудальные размеры эмбриона, см	3,2±0,2	3,0±0,1	3,1±0,3
Продолжительность беременности, сут.	22,1±0,09	21,8±0,05	22,6±0,10
Родившиеся крысята на самку, гол.	9,3±0,4	9,8±0,6	9,5±0,5
Масса помета, г	45,57±1,28	47,04±1,52	46,83±1,44
Аномалии развития, %:			
внешнего вида	0,13	0,14	0,14
костной системы	0,11	0,12	0,11
внутренних органов	0,07	0,06	0,07

В результате проведенного исследования было выявлено, что применение препарата эсвелан беременным крысам, не приводило к снижению их массы тела по отношению к контрольным животным, не оказывало существенного влияния на количественные характеристики желтых тел, показатели предимплантационной и постимплантационной смертности, общей эмбриональной смертности (табл. 13). При исследовании возможных тератогенных свойств эсвелана в условно-терапевтической и высшей испытуемой токсичной дозе установлено, что он не оказал негативного влияния на развитие и состояние внутренних органов плодов. При осмотре обращали внимание на наличие уродств (заячья губа, волчья пасть, анэнцефалия, гидроцефалия и др.), которых во всех группах не выявлено.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют об отсутствии у препарата эсвелан эмбриотоксического и тератогенного эффекта.

### **Заключение по разделу**

Выполненные экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что при однократном пероральном введении нелинейным крысам и собакам в диапазоне доз от 940 до 15900 мг/кг массы тела токсический эффект у эсвелана не установлен. При этом среднесмертельная доза ( $LD_{50}$ ) препарата в остром опыте выявлена не была. Следовательно, эсвелан в соответствии с нормативами ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4 классу опасности – вещества малоопасные.

Результаты проведенных исследований при длительном применении эсвелана лабораторным крысам в дозах, составляющих 1/10, 1/20 и 1/50 от максимально используемой в остром опыте, не выявили его токсического действия на организм лабораторных животных. При этом эсвелан оказывает опосредованное положительное действие на ряд биохимических показателей крови, стимулируя белковый и липидный обмен. Кроме того препарат проявляет ростостимулирующее действие. Экспериментально доказано отсутствие

у эсвелана местного раздражающего действия, а также эмбриотоксического и тератогенного эффекта.

Таким образом, установлено, что препарат эсвелан, как при кратковременном, так и при длительном применении безвреден для теплокровных животных, при поверхностном нанесении не проявляет местного раздражающего действия.

#### **4.4 Фармакологические свойства эсвелана**

##### **4.4.1 Изучение эффективности препарата эсвелан при лекарственно-индуцированном поражении печени лабораторных животных**

Проблема лекарственной гепатотоксичности в настоящее время особенно актуальна, учитывая тенденцию к постоянному увеличению случаев регистрации побочных эффектов у различных фармацевтических препаратов. В большинстве прецедентов лекарственно-индуцированные поражения печени связывают с приемом антимикробных и нестероидных противовоспалительных средств. Из этой группы к веществам, оказывающим негативное воздействие на гепатобилиарную систему и способным блокировать ферментную систему гепатоцитов, относятся антибиотики класса поликетидов – тетрациклины [6].

С учетом этого тетрациклиновое поражение печени у животных широко используется в фармакологических экспериментах при изучении лекарственных препаратов гепатопротективного профиля. При изучении фармакологических свойств эсвелана экспериментальное поражение печени у животных вызывали внутрижелудочным введением лабораторным крысам тетрациклина гидрохлорида в виде суспензии с Tween-80 (1:10) в дозе 0,5 г/кг массы тела ежедневно в течение 7 дней [102]. Эксперименты проводили на нелинейных крысах, которых разделили на пять групп по 10 животных в каждой.

При воспроизведении лекарственно-индуцированного поражения печени крысам 3 опытных групп за час до введения тетрациклина и в последующие 7 дней ежедневно *per os* вводили эсвелан в разных дозах, схема опыта представлена в таблице 14.

Ежедневно регистрировали сохранность и проводили клинический осмотр животных, гравиметрические исследования осуществляли три раза – фоновое, в середине и в конце опыта.

Таблица 14 – Схема опыта по изучению свойств эсвелана при экспериментальном лекарственном поражении печени крыс (n=10)

Группы	Условия эксперимента		
	Затравка	Лечение	
1 – опытная	внутрижелудочное введение тетрациклина гидрохлорида в виде суспензии с Tween-80 (1:10) в дозе 0,5 г/кг массы тела ежедневно в течение 7 дней	эсвелан в дозе 0,1 мл/кг массы тела	за час до применения антибиотика и в последующие 7 дней ежедневно <i>per os</i>
2 – опытная		эсвелан в дозе 0,2 мл/кг массы тела	
3 – опытная		эсвелан в дозе 0,3 мл/кг массы тела	
4 – контроль		Без лечения	
5 – интактная группа	Здоровые животные		

В результате проведенных экспериментов установлено, что гибели крыс в группах не было. У животных группы без лечения при клиническом обследовании установлено проявление интоксикации: средняя степень угнетения в течение второй половины опытного периода, проявляющиеся снижением двигательной активности и реакций на внешние раздражители; шерстный покров взъерошенный, тусклосклый, со следами загрязнения; слизистые оболочки иктеричны. При этом потребление воды – в пределах нормы, а корма – снижено. Клиническим осмотром животных из групп с применением эсвелана зарегистрировано, что состояние крыс несколько угнетенное, снижено потребление корма, но шерстный покров чистый и матовый, слизистые

оболочки розового цвета без желтушности. Специфических симптомов интоксикации не установлено [88].

Динамика массы тела лабораторных крыс, участвующих в опыте, представлена в таблице 15. При анализе этих данных видно, что у животных группы без лечения на протяжении всего опыта регистрировалась потеря массы тела (при достоверной разнице к концу опыта на 14,3 %).

Таблица 15 – Динамика массы крыс при изучении препарата эсвелан при экспериментальном лекарственном поражении печени ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )

Группа	Масса тела, г		
	начальная	на 7 день	на 14 день
1 – опытная	197,3±2,18	189,0±2,53	186,9±1,84
2 – опытная	201,4±3,26	193,0±2,55	190,6±1,77
3 – опытная	189,7±1,49	184,8±2,42	181,1±3,54
4 – контроль	192,6±3,44	181,5±3,15*	168,5±2,57**
5 – интактная группа	186,7±2,56	192,5±1,53	194,7±2,86

Примечание: различия достоверны (\* $P \leq 0,05$ ; \*\* $P \geq 0,01$ ) в сравнении с животными интактной группы

Вес животных в группах с применением эсвелана по завершении экспериментального периода хотя и снизился, но изменения были незначительные. Разница в массе тела между фоновыми данными и показателями в конце опыта составила по группам: 1 – 5,7 %; 2 – 5,6 %; 3 – 4,7 %. У интактных животных зарегистрирован положительный пророст массы тела с прибавкой в 4,3 %.

При воспроизведении лекарственно-индуцированного поражения печени у крыс развивался процесс деструкции гепатоцитов, подтвержденный повышением активности ферментов-маркеров состояния печени (табл. 16).

Концентрация ферментов, свидетельствующих о развитии цитолиза, у животных без лечения была значительно повышена – АсАТ в 1,5 раза и АлАТ в 1,8 раза относительно интактных крыс. В группах с терапией эсвеланом раз-

ница в содержании ферментов относительно контрольной 4 группы составила: по АсАТ – в 1 на 17,8 %, во 2 на 25,5% ( $P \leq 0,05$ ) и в 3 на 27,8 % ( $p \geq 0,001$ ); по АлАТ – в 1 на 33,2 % ( $p \leq 0,05$ ), во 2 на 43,6 % ( $p \geq 0,001$ ) и в 3 на 37,7 % ( $p \leq 0,05$ ).

Таблица 16 – Влияние эсвелана на активность ферментов крови крыс при экспериментальном лекарственном поражении печени ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Группа	Показатель, Ед/л		
	ЩФ	АсАТ	АлАТ
1 – опытная	428,2±11,7	118,7±3,9	40,3±2,4*
2 – опытная	421,2±9,9	111,4±4,5*	37,4±3,1**
3 – опытная	418,3±8,5	109,4±6,3**	39,0±2,5*
4 – контроль	470,2±16,3	139,8±5,7	53,7±3,6
5 – интактная группа	390,5±15,6	96,8±4,2	29,6±2,8

Примечание: различия достоверны (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \geq 0,001$ ) в сравнении с животными 4 группы

Таким образом, у крыс с экспериментальным лекарственно-индуцированным поражением печени установлена доминанта АлАТ, которая является цитоплазматическим ферментом, а ее содержание повышается при незначительном повреждении гепатоцитов.

Повышение содержания ЩФ в первых трех опытных группах – на 9,6 % (1 группа), на 7,7 % (2 группа) и на 7,1 % (3 группа) относительно к интактной группе свидетельствует о развитии малопроявляемых холестатических нарушениях у крыс, тогда как в группе без лечения разница составила 20,4 %.

Изучение показателя пигментного обмена – билирубина выявило достоверное увеличение его концентрации у крыс с экспериментальным поражением печени. Так, уровень общего билирубина у крыс, получавших тетрациклин в токсичной дозе, в конце опыта достоверно превышал показатель интактных животных: в 1 группе в 1,54 раза ( $p \geq 0,01$ ); во 2 группе в 1,4 раза

( $p \leq 0,05$ ); в 3 группе в 1,48 раз ( $p \leq 0,05$ ); в 4 группе в 2,1 раза ( $p \geq 0,001$ ). Максимальная разница между группой с лечением и без применения гепатопротекторов составила 56,3 %, что свидетельствует об гепатопротективных свойствах эсвелана (рис. 17).

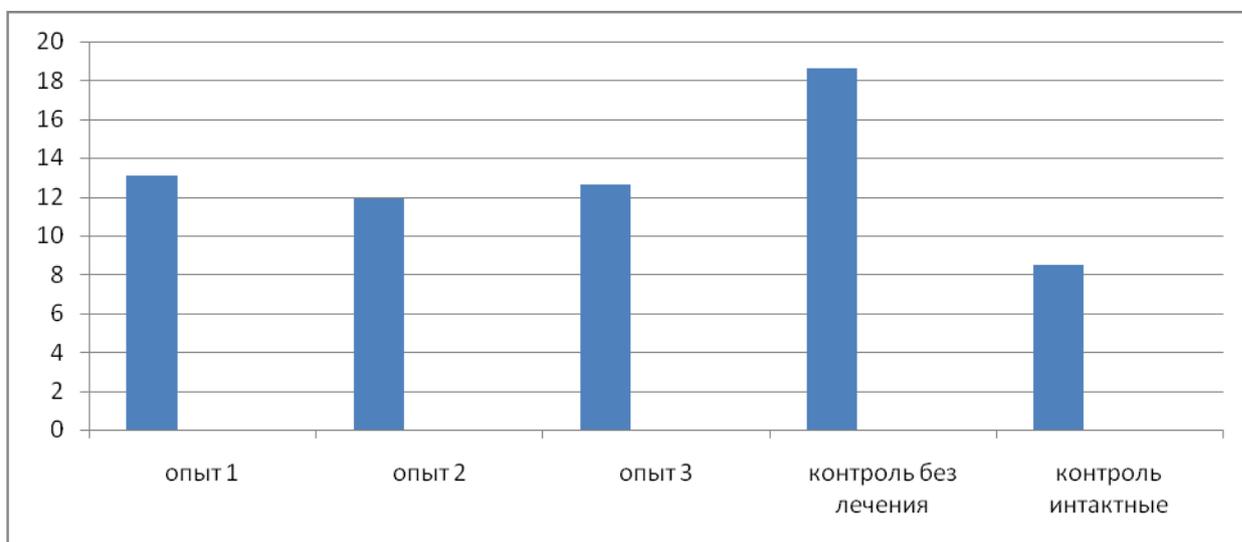


Рис. 17 – Концентрация общего билирубина в крови крыс при изучении препарата эсвелан при экспериментальном лекарственном поражении печени

Результаты исследований ряда параметров белкового обмена свидетельствуют о нарушениях протеинового метаболизма у крыс с экспериментальной печеночной недостаточностью (табл. 17).

Таблица 17 – Влияние эсвелана на белковый и углеводный обмены крыс при экспериментальном лекарственном поражении печени ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Группа	Показатель		
	Общий белок, г/л	Мочевина, мМ/л	Глюкоза, мМ/л
1 – опытная	68,9±1,23*	7,86±0,34	5,38±0,19
2 – опытная	70,3±0,98*	7,95±0,25	5,76±0,37
3 – опытная	69,7±0,17**	8,11±0,13*	5,42±0,21
4 – контроль	63,8±2,14**	6,97±0,36**	4,95±0,48
5 – интактная группа	73,6±1,95	9,15±0,27	5,99±0,32

Примечание: различия достоверны (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \geq 0,001$ ) в сравнении с животными интактной группы

Эти данные свидетельствуют о том, что при лекарственно-индуцированном поражении печени у крыс наблюдалась выраженное нарушение протеинсинтетической функции печени, превентивное же воздействие эсвелана позволяет значительно снизить развитие патологических процессов в организме [88].

Метаболические расстройства организма животных, сопровождающие развитие поражения печени при воздействии тетрациклина приводили к активации процессов ПОЛ, что отражалось в увеличении концентрации продуктов липопероксидации (табл. 18).

Таблица 18 – Влияние эсвелана на концентрацию продуктов ПОЛ крыс при экспериментальном лекарственном поражении печени ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Группа	Показатель		
	ДК <sub>(232)</sub> , опт.ед	КД <sub>(273)</sub> , опт.ед	МДА <sub>(537)</sub> , мкМ/л
1 – опытная	0,18±0,01**	0,17±0,04	2,48±0,15*
2 – опытная	0,16±0,03*	0,15±0,01*	2,34±0,24*
3 – опытная	0,15±0,05***	0,14±0,04**	2,37±0,11**
4 – контроль (без лечения)	0,22±0,02	0,19±0,03	3,23±0,26
5 – интактная группа	0,14±0,01	0,12± 0,02	1,58±0,19

Примечание: различия достоверны (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ) в сравнении с животными 4 группы

Анализ полученных данных свидетельствуют о наличии у препарата эсвелан антиоксидантных свойств, что проявилось в снижении содержания продуктов липопероксидации в опытных группах в сравнении с крысами без лечения:

ДК – в 1 на 22,2 % ( $p \geq 0,01$ ), во 2 на 37,5 % ( $p \leq 0,05$ ) и в 3 на 47 % ( $p \geq 0,001$ );

КД – в 1 на 11,8 %, во 2 на 26,7 % ( $p \leq 0,05$ ) и в 3 на 35,7 % ( $p \geq 0,01$ );

МДА – в 1 на 30,2 % ( $p \leq 0,05$ ), во 2 на 38 % ( $p \leq 0,05$ ) и в 3 на 36,3 % ( $p \geq 0,01$ ).

Полученные в модельном эксперименте данные о значительной антиоксидантной активности эсвелана согласуются с существующими представ-

лениями о механизмах антиоксидантного действия компонентов препарата, таких как фосфолипиды, силимарин и дигидрохверцетин.

В целом результаты опыта свидетельствуют о том, что при интоксикации тетрациклином у крыс происходит повышение концентрации аминотрансфераз, свидетельствующее о повреждении гепатоцитов, приводящих к выходу внутриклеточных субстанций в кровь. Этот процесс сопровождается внутрипеченочным холестазом и нарушением протеинсинтезирующей функции печени. Тогда как применение гепатопротектора эсвелана улучшает параметры биохимического гомеостаза и состояния печени подопытных крыс на фоне лекарственно-индуцированного токсикоза.

Проведенные гистологические исследования подтвердили эффективность эсвелана при тетрациклиновом повреждении печени крыс. При этом лучший результат получен во второй и третьей опытных группах, где эсвелан применялся в дозах 0,2 и 0,3 мл/кг массы тела. У этих крыс в сравнении с четвертой группой отмечалось увеличение количества клеток Купфера, фигур митозов и двуядерных клеток в гепатоцитах. Ближе к центру долек находили скопление темно-окрашенных гепатоцитов с гиперхромными ядрами, а балочное строение долек печени визуализировалось более упорядоченным, что свидетельствовало о защите структуры и стимуляции регенераторных процессов в печени под влиянием эсвелана.

Таким образом, приведенные в данном разделе результаты свидетельствуют о том, что применение крысам препарата эсвелан в разных дозах при лекарственно-индуцированном поражении печени сопровождалось ингибированием процессов свободнорадикального окисления, нормализацией биохимических показателей, при повышении стабильности структур поврежденной печени. Выявлено, что наиболее эффективно применение эсвелана в дозах 0,2 и 0,3 мл/кг массы тела, с учетом этого в дальнейших экспериментах терапевтическая доза препарата будет составлять 0,2 мл/кг массы тела [88].

#### 4.4.2 Изучение эффективности препарата эсвелан при экспериментальном поражении печени у лабораторных животных тетрахлорметаном

Изучение специфической гепатопротекторной активности эсвелана проведено при повреждении печени  $CCl_4$ , который является одним из рекомендуемых гепатотропных ядов для моделирования токсического поражения печени.

Опыты проведены на нелинейных крысах, имеющих среднюю массу тела  $205,7 \pm 3,1$  г. В опытах использовались животные после карантинного режима вивария Краснодарского НИВИ и без внешних признаков заболеваний. С целью получения статистически достоверных результатов группы формировались по принципу парных аналогов.

Изучение эффективности эсвелана проводили на экспериментальной модели острого гепатита у крыс, вызванного тетрахлорметаном в соответствии с «Методическими указаниями по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ». Токсическое поражение печени моделировали однократным внутрибрюшинным введением четыреххлористого углерода ( $CCl_4$ ) в виде 50 %-ного раствора на оливковом масле комнатной температуры в дозе 0,4 мл/кг массы тела животного.

Перед постановкой опыта крыс разделили на 3 группы по 10 животных в каждой: 1 опытная – с лечением, 2 группа позитивного контроля – без лечения; 3 группа интактного контроля. Животным первой группы при затравке  $CCl_4$  за час до применения гепатотоксиканта и в последующие 30 дней ежедневно *per os* вводили эсвелан в дозе 0,2 мл/кг массы тела животного. Вторая группа при затравке находилась без лечения. Третья группа состояла из интактных здоровых крыс.

Гепатозащитную эффективность эсвелана оценивали по сохранности крыс, динамики их массы тела, клиническим признакам и изменениям биохимических показателей крови, характеризующих основные патологические

синдромы, наблюдающиеся при поражениях печени: цитолиза – по активности в сыворотке аминотрансфераз; холестаза – по уровню щелочной фосфатазы, билирубина и холестерина.

Кровь для биохимического исследования отбирали у пяти крыс из каждой группы 2 раза – через 15 дней от начала опыта и через сутки от завершающего введения эсвелана. Интенсивность процессов перекисного окисления липидов оценивали по уровню в крови животных диеновых конъюгантов, кетодиенов и малонового диальдегида.

Через сутки после завершающего введения эсвелана животных подвергали эвтаназии передозировкой эфира с оценкой макро- и микроструктуры органов. Также проводили определение концентрации малонового диальдегида в ткани печени крыс спектрофотометрически в тесте с тиобарбитуровой кислотой. Методика основывается на измерении спектра поглощения комплекса, который образуется между 2-тиобарбитуровой кислотой и водорастворимыми продуктами липопероксидации, в том числе МДА. 250 мг ткани печени гомогенизировали, потом добавляли 2 мл физиологического раствора при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  и 0,01 мл 0,08 М раствора ионола в этаноле. Отбирали 0,4 мл гомогената и последовательно добавляли 0,01 мл 0,08 М раствора ионола, 3 мл 2 % фосфорной кислоты и 1 мл 0,8 % ТБК. Каждый раз пробирки встряхивали, потом закрывали пробками и помещали в кипящую водяную баню при температуре  $+100^{\circ}\text{C}$  на один час. Затем пробы охлаждали и приливали по 4 мл н-бутанола для экстрагирования окрашенного комплекса ТБК с МДА. Интенсивно встряхивали, плотно закрывали и оставляли на 20 минут при комнатной температуре для экстракции окрашенного комплекса. Потом образцы 20 мин центрифугировали при 2000 об/мин. Оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре против чистого бутанола в кюветах с длиной оптического пути 1 см при двух длинах волн – 532 нм и 580 нм. Расчет концентрации МДА проводили по разнице оптических плотностей  $E_{532}$  и  $E_{580}$  и выражали в мкмоль/г ткани.

В результате проведенных исследований установлено, что при введении крысам  $CCl_4$  в группе без терапии уже на 2 день опыта начали проявляться внешние признаки интоксикации: угнетение, отсутствие аппетита, одышка, у некоторых крыс повышение температуры тела. На 3 день одна крыса пала, а у животных группы, получавших эсвелан, клинические проявления интоксикации были менее выражены, и регистрировалось только к 4 суткам от начала опыта, при 100 % сохранности.

Взвешивание животных показало, что у крыс второй группы на протяжении опыта регистрировалась потеря массы тела, а в группе с лечением эсвеланом к концу эксперимента вес, хотя и не достиг показателей интактных крыс, но увеличивался с положительной динамикой. При пересчете процента прироста массы тела первой и второй группы разница составила 12,7 % со степенью достоверности  $p \leq 0,001$ . Результаты представлены таблице 19.

Таблица 19 – Влияние эсвелана на динамику массы тела крыс при экспериментальном тетрахлорметановом гепатите ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Группы	Масса тела (г)		
	Фон	Через 15 дней	Через 30 дней
1 опытная	205,8±3,3	206,8±2,4*	229,5±1,8**
2 опытная	206,5±2,4	199,2±1,1	203,7±2,9
3 контрольная	204,7±3,5	218,7±4,2	231,0±2,5

Примечание: различия достоверны (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \geq 0,001$ ) в сравнении с животными, получавшими  $CCl_4$  без терапии

Биохимическим исследованием крови выявлено, что интоксикация  $CCl_4$  приводит к значительному изменению метаболического состояния организма (табл. 20). Введение крысам четыреххлористого углерода приводило к повышению активности аминотрансфераз. В группе без лечения на 15 день опыта достоверно возросло содержание АсАТ в 2,7 раза, а к концу эксперимента разница с интактными животными составила 1,6 раза. Концентрация АлАТ возрасла к середине опыта в 3,7 раза, а к концу – в 2 раза по сравнению с данными, полученными в контрольной группе крыс.

Таблица 20 – Влияние эсвелана на биохимические показатели крови крыс при экспериментальном тетрахлорметановом гепатите ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Показатели	1 опытная		2 опытная		3 контрольная	
	Дни опыта					
	15	30	15	30	15	30
Об. белок, г/л	88,5±3,25*	81,4±2,28**	93,3±3,06	74,1±3,83	82,4±1,92	83,9±2,11
Мочевина, мМ/л	6,83±0,27	7,12±0,17*	6,64±0,32	3,82±0,41	7,25±0,55	7,38±0,37
АсАт, Ед/л	194,9±7,6**	125,7±6,1**	257,6±5,8	174,3±7,6	95,5±3,5	106,4±5,0
АлАт, Ед/л	158,4±4,2**	90,8± 3,9**	209,6±8,9	125,0±6,2	57,3±4,8	63,5±3,9
ЩФ, Ед/л	703,9±17,0*	648,5±9,7*	711,0±16,4	1107,2±25,3	576,5±13,5	585,0±17,0
Холестерин, мМ/л	2,13±0,22**	1,25±0,13**	7,83±0,09	5,45±0,18	1,53±0,03	1,48±0,02
Об. билируб., мкМ/л	20,7±3,5***	16,3±2,7**	43,7±4,3	30,9±2,9	9,4±1,2	10,5±0,9

Примечание: различия достоверны (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ) в сравнении с животными, получавшими  $CCl_4$  без терапии

Концентрация АсАТ у крыс 1 группы, получавших эсвелан, к середине опыта была ниже этого же показателя во 2 группе на 32,2 % ( $p \leq 0,01$ ), а к концу на 38,7 % ( $p \leq 0,001$ ), но при этом превысила значения контрольных крыс. В содержании АлАТ прослеживалась аналогичная динамика: разница на 15 сутки наблюдений составила 32,3 % ( $p \leq 0,001$ ) и на 30 день исследований 37,7 % ( $p \leq 0,01$ ) относительно крыс второй группы, но оставалось выше соответствующего показателя у интактных животных.

В показателях желчеобразования у всех животных опытных групп была зарегистрирована гипербилирубинемия, при которой концентрация общего билирубина в группе без лечения к концу эксперимента превысила показатели крыс первой группы в 1,9 раза. Уровень щелочной фосфатазы во второй группе к концу наблюдений вырос в 1,89 раза, а во второй – только на 10,9 %. Подобная картина свидетельствует о наличии холестатического синдрома, вызванного нарушением желчевыделительной функции печени и поражением желчных канальцев (внутрипеченочный холестаза). Введение четыреххлористого углерода обусловило нарушение протеинсинтетической функции пе-

чени, что подтверждалось снижением содержания общего белка у животных второй группы на 13,2 % по отношению к здоровым крысам. Применение гепатопротектора позволило минимизировать развитие обменных нарушений – разница по первой группе составила 3,1 %.

Полученные данные свидетельствуют о том, что интоксикация четыреххлористым углеродом приводит к повышению уровня аминотрансфераз, свидетельствующее о повреждении гепатоцитов и выходу внутриклеточных субстанций в кровь. Данный процесс сопровождается внутрипеченочным холестазом и нарушением протеинсинтетической функции печени. Тогда как применение эсвелана улучшает параметры биохимических показателей и функционального состояния печени подопытных крыс на фоне токсического поражения.

Развитие интоксикации у животных сопровождалась усилением процессов ПОЛ, что подтвердилось увеличением всех продуктов липопероксидации (табл. 21).

Таблица 21 – Влияние эсвелана на показатели ПОЛ крови крыс при экспериментальном тетрахлорметановом гепатите ( $M \pm m$ ;  $n=5$ )

Показатели	1 опытная	2 опытная	3 контрольная
	15 день опыта		
ДК <sub>(232)</sub> , опт.ед	0,265±0,025**	0,390±0,030	0,115±0,005
КД <sub>(273)</sub> , опт.ед	0,140±0,010***	0,285±0,005	0,100±0,010
МД <sub>(537)</sub> , мкМ/л	2,595±0,195**	3,930±0,300	1,690±0,160
Конец опыта			
ДК <sub>(232)</sub> , опт.ед	0,155±0,005**	0,270±0,020	0,120±0,010
КД <sub>(273)</sub> , опт.ед	0,125±0,001*	0,190±0,010	0,105±0,015
МД <sub>(537)</sub> , мкМ/л	1,850±0,280*	2,450±0,350	1,500±0,150

Примечание: (\* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ) различия достоверны в сравнении с животными, получавшими  $CCl_4$  без терапии

При анализе этих данных было выявлено, что при токсическом повреждении печени  $CCl_4$  в группе без лечения происходило интенсивное накопление, как начальных продуктов ПОЛ – ДК и КД, так и конечных – МДА.

Различия между здоровыми животными третьей группы и крысами второй опытной группы (без лечения) составили:

к середине опыта – ДК в 3,4 раза, КД в 2,8 раза и МДА в 2,3 раза;

в конце опыта – ДК в 2,3 раза, КД в 1,8 раза и МДА в 1,6 раза.

Фармакологические свойства эсвелана проявились в превентивном действии в развитии патологической генерации ПОЛ под влиянием токсиканта. Так, разница между здоровыми животными третьей группы и крысами первой опытной группы (лечение эсвеланом) составила:

к середине опыта – ДК в 2,3 раза, КД в 1,4 раза и МДА в 1,5 раза;

в конце опыта – ДК в 1,3 раза, КД в 1,2 раза и МДА в 1,2 раза.

При сравнении показателей ПОЛ в опытных группах, разница в сторону увеличения концентрации у животных без лечения составила:

к середине опыта – ДК на 47,1 %, КД в 2 раза и МДА на 51,4 %;

в конце опыта – ДК в 1,7 раза, КД на 52 % и МДА на 32,4 %.

При определении в конце опыта концентрации МДА в ткани печени экспериментальных животных установлено (рис. 18), что воздействие на организм крыс четыреххлористого углерода приводило к интенсификации ПОЛ, которое подтверждалось достоверным ( $p \leq 0,05$ ) повышением концентрации МДА ( $55,6 \pm 1,85$  и  $80,4 \pm 3,17$  мкМ/г ткани соответственно по 1 и 2 опытным группам) по сравнению с группой здоровых животных ( $35,4 \pm 1,26$  мкМ/г ткани). При расчете разница между группами с применением эсвелана и без лечения составила 44,6 % [84].

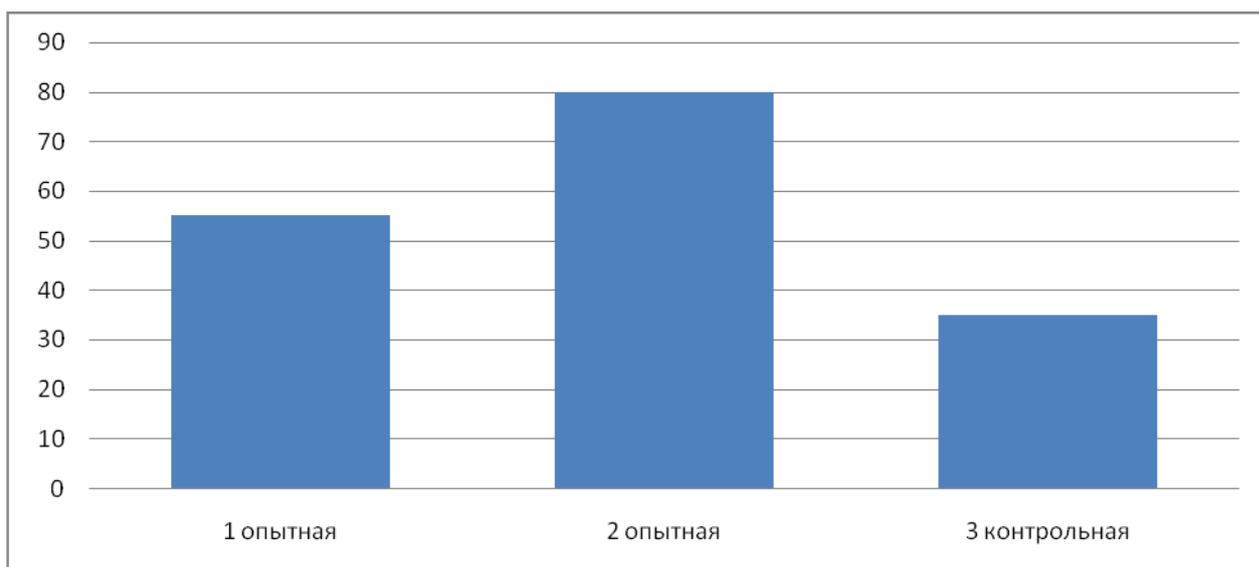


Рис. 18 – Влияние эсвелана на концентрацию МДА (µМ/г) в ткани печени крыс при интоксикации  $\text{CCl}_4$

Следовательно, фармакологическое действие эсвелан оказывает на метаболическом уровне, проявляя антиоксидантные свойства при загрузке  $\text{CCl}_4$ , обусловленной наличием продуктов перекисного окисления липидов, образующихся при процессе метаболизма с влиянием системы цитохрома Р-450. В клетках свободные радикалы выступают в качестве индукторов липопероксидации и при взаимодействии с ненасыщенными жирными кислотами отсоединяют у них атом водорода, и соответственно опять образуются липидные перекислы, которые инициируют каскад цепных реакций с повышенной генерацией продуктов липопероксидации. При этом характерные поражения выявляются в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, что отражается на активности внутриклеточных ферментов и приводит к снижению детоксикационной функции печени, а также оказывает ингибирующее действие на процессы биосинтеза белка, вызывая разрушение РНК, разобщение процессов окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания [33, 61, 78].

При патологоанатомическом обследовании у крыс опытной группы без лечения установлены патологические изменения, проявляющиеся, в разной

степени увеличением печени в размерах, ее дряблостью, изменением цвета, неоднородностью окраски, закруглением краев (рис. 19).

Применение эсвелана снижало степень интоксикации организма, поскольку макроскопические изменения в печени животных, получавших лечение, были менее выражены – цвет близок к нормальному, консистенция упругая, края закруглены незначительно (рис. 20).



Рис. 19

Печень крысы при затравке  
в группе без лечения



Рис. 20

Печень крысы при затравке  
в группе с применением эсвелана

При гистологическом исследовании тканей печени у крыс второй опытной группы регистрировались: деструкция, растворение и распад печеночных клеток; вены и синусоидные капилляры расширены и заполнены форменными элементами крови (рис. 21 и 22).

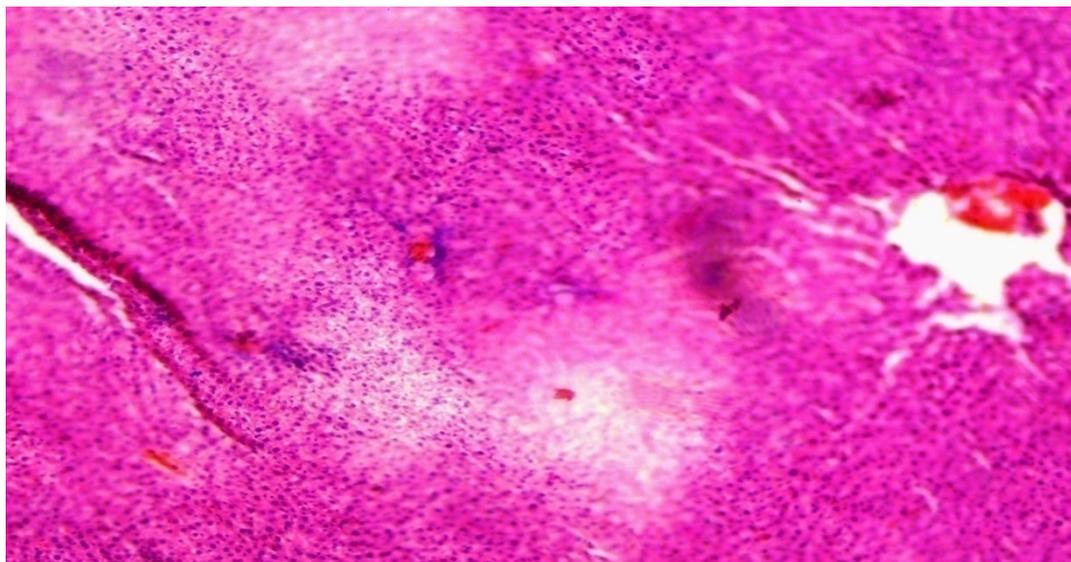


Рис. 21 – Токсическая дистрофия печени у животных при интоксикации тетрахлорметаном в группе без лечения

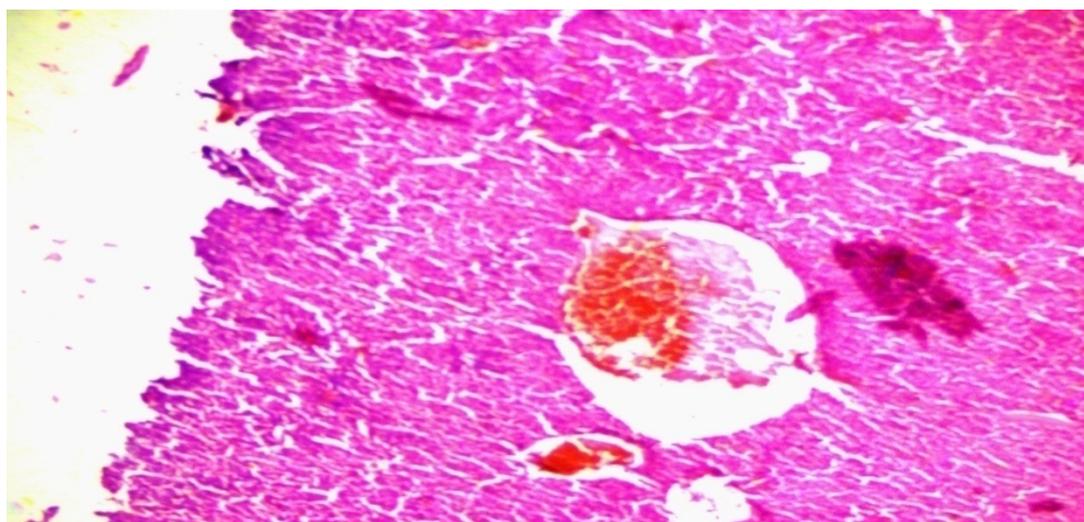


Рис. 22 – Изменения сосудов печени у животных при интоксикации тетрахлорметаном в группе без лечения

У животных, защищенных с помощью эсвелана от повреждающего действия  $CCl_4$ , массово не развивались типичные для гепатита патологические изменения – значительно слабее были выражены дисконфлексация печеночных пластинок, воспалительная инфильтрация, дистрофия паренхимы печени, с уменьшением количества некротизированных гепатоцитов.

У трех животных из второй группы в почках регистрировались мно-

гочисленные кровоизлияния с эритростазом и признаками мелкоочагового гемолиза эритроцитов на фоне ярко выраженного отека межтубулярной ткани. Некоторые группы почечных клубочков визуализировались отечными и имели признаками незначительной гипертрофии, происходящей за счет набухания мезангиальных клеток, эндотелиоцитов клубочковых капилляров и эпителия клубочковой капсулы.

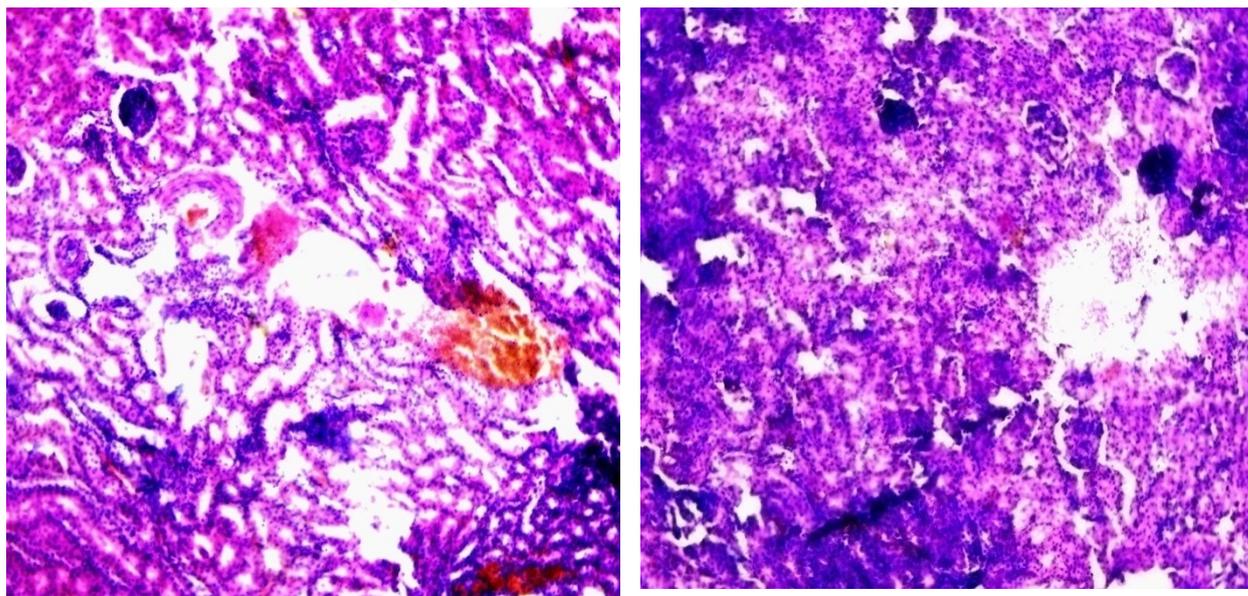


Рис. 23 – Патологические изменения в почке крыс в группе без лечения

Значительная доля ядер эпителия, с доминантой в проксимальных канальцах, находились на стадии пикноза и лизиса, именно по этой причине промежутки по границе между эпителиальными клетками в местах их соприкосновения были расширенными. Регистрировались признаки некротического нефроза с очаговой эксфолиацией нефроцитов (рис. 23). В группе с лечением эсвелананом патологии в почках не установлено.

Таким образом, резюмируя результаты изучения фармакологической эффективности эсвелана при экспериментальном поражении печени лабораторных животных тетрахлорметаном, можно утверждать, что препарат обладает выраженными гепатопротективными свойствами, способствующими снижению общего токсического, цитолитического и холестатического проявлений повреждающего действия токсиканта [156].

## **4.5 Разработка показаний к применению эсвелана**

### **4.5.1 Изучение эффективности эсвелана при лекарственно-индуцированном поражении печени у собак**

В современной медицине синтетические глюкокортикостероиды (ГКС) используются в лечении многих острых и хронических воспалительных заболеваний, в том числе и многих аутоиммунных заболеваний, например, иммуно-опосредованного полиартрита. Преднизолон – гормональное средство, является дегидрированным аналогом гидрокортизона, наиболее часто используется в клинической практике для фармакодинамической терапии и рассматривается как стандартный препарат при полиартрите. Несмотря на достоинства ГКС при лечении, как правило, требуется длительный курс применения, что может привести к патологическим изменениям функции печени [51, 90, 189].

В рамках проводимых исследований изучалось состояние печени у собак при длительном применении преднизолона в терапии иммуноопосредованных артритов, а также оценка эффективности препарата эсвелан при лекарственно-индуцированном поражении печени у животных.

Динамическое исследование приводилось в два этапа:

1. изучение состояния печени собак при длительном применении ГКС в терапии иммуноопосредованных артритов;
2. разработка подходов к снижению гепатотоксического действия преднизолона у животных с использованием гепатопротекторов.

Для формирования групп в ветеринарных клиниках города-курорта Анапы и города Северная Гавань Хабаровского края в течение двухлетнего периода всего было отобрано 100 собак, больных полиартритом, разных пород и полов, возраст животных был в диапазоне 5-6 лет, весовая категория от 19 до 29 кг.

Главной причиной обращения за помощью в ветеринарные клиники при иммуно-опосредованном полиартрите явились: снижение активности

собак, отказ от игр с хозяином, животное испытывает затруднения при спусках и подъемах, наличие хромоты, значительное увеличение суставов в объеме.

Диагностику иммуноопосредованного артрита проводили на основании анамнеза, выявленных клинических признаков болезни, рентгенологического исследования суставов, а также цитологического и бактериологического исследования синовиальной жидкости.

Клинически проводили оценку состояния и поведения собак, пальпировали и измеряли окружность и объем движений сустава, оценивали массу тела. Лабораторными исследованиями изучали системные воспалительные процессы по данным клинического анализа крови (СОЭ, гемоглобин, эритроциты и лейкоциты, лейкоформула). Местные воспалительно-дегенеративные процессы, развивающиеся в суставе, определяли по качественному составу клеточных элементов содержимого суставной полости, проводили морфометрическое изучение тканей суставов.

У всех животных в динамике проводилась УЗИ-диагностика брюшной полости и печени, а также биохимическое исследование крови на содержание гепатоиндикаторных метаболитов: АлАТ, АсАТ, ЩФ и общего билирубина.

При постановке опыта собак, имевших сопутствующую патологию печени, в опыт не включали.

В период исследований собакам в группах была подобрана примерно одинаковая программа кормления лечебными кормами. Всем животным проведено несколько курсов лечения преднизолоном (продолжительность курса 30 дней, максимальная суточная доза 0,6 мг на 1 кг массы тела давалась перорально 2 раза в день в течение 3 недель, отмена производилась постепенным снижением дозы до 0,25 мг на 1 кг в течение 10 дней). Также были назначены хондропротекторы и физиотерапия, при необходимости применялись обезболивающие средства.

На втором этапе исследований (через 30-45 дней терапии преднизолоном) отбирали животных с выявленными начальными признаками лекарственно-индуцированного поражения печени, которых разделили на 3 группы по 10 особей в каждой. В первой опытной группе собак дополнительно к базовому лечению назначали эсвелан, который применяли индивидуально внутрь 1 или 2 раза в день (с общей суточной дозой 0,2 мл на 1 кг массы тела) месячными курсами с перерывом в 2 недели. Животные второй опытной группы в качестве гепатопротектора получали гепатовет в дозе 0,1 мл/кг массы тела внутрь за 30 минут до кормления три раза в день в течение 30 дней, также с двухнедельными перерывами. Всего собакам проводилось 1-2 курса гепатотропной терапии, что находило отражение в формировании экспериментальных групп методом парных аналогов. Третья группа собак была контрольной, где лечение проходило без применения гепатопротекторных препаратов [90].

В результате проведенных опытов установлено, что при мониторинговой оценке состояния собак, длительный период получавших преднизолон, у всех животных зарегистрирован положительный эффект в терапии иммуноопосредованного артрита. Но у 48 % собак при пальпации границ печени выявлена умеренная гепатомегалия, без значительной болезненности. Также при ультразвуковой диагностике установлены патологические изменения в печени – воспалительного характера (16 % случаев) и дистрофического (32 % случаев).

На рисунке 24 приведен пример ультсографии печени собаки с признаками дистрофического поражения. Клинический случай № 4 – собака, кличка Айра, в возрасте пять лет: печень незначительно увеличена в размере, край печени закруглен, эхогенность печени повышена, в верхней левой доли печени имеется образование повышенной эхогенности округлой формы.



Рис. 24 – УЗИ печени собаки с признаками дистрофических изменений

Биохимическими исследованиями установлено, что у собак, с признаками развития патологических процессов в печени регистрировались изменения, указывающие на гепатоцеллюлярную утечку и холестаза (табл. 22).

Таблица 22 – Динамика биохимических показателей крови собак при лекарственно-индуцированном поражении печени ( $M \pm m$ ;  $n=48$ )

Показатели	Фон	После 30-45 дней терапии	Норма
АлАТ, Ед/л	$43,6 \pm 1,3$	$62,8 \pm 2,1^*$	15-58
АсАТ, Ед/л	$34,5 \pm 1,9$	$45,6 \pm 1,4^*$	16-43
ЩФ, Ед/л	$83,1 \pm 3,5$	$112,4 \pm 5,2$	10-100
Об. билирубин, мкМ/л	$6,7 \pm 0,4$	$9,3 \pm 0,2$	1,7-10

Примечание: \* – степень достоверности  $p \leq 0,05$  по отношению к фону

Так, в концентрации гепатоиндикаторных ферментов в крови собак происходило достоверное возрастание показателей, превышающее границу нормы. После длительной терапии преднизолоном в крови собак содержание

АлАТ превышало фоновый показатель на 44 %, а разница по АсАТ была 32,2 %. Выявленная гиперфосфатаземия свидетельствует об умеренном холестазе у животных (содержание ЩФ выявлялось на уровне  $112,5 \pm 4,2$  Ед/л, что превышает норму). При изучении пигментного обмена хотя и не установлено гипербилирубинемии, но динамичное исследование общего билирубина выявило повышение его концентрации к концу опыта на 38,8 % от фоновых данных.

Существует несколько классификаций лекарственных поражений печени, но наиболее часто в клинической практике применима классификация, предложенная в 1993 г. CIOMS (Councils for International Organizations of Medical Sciences), в основе которой заложен принцип оценки активности биохимических показателей сыворотки крови: аминотрансфераз, щелочной фосфатазы и билирубина. Согласно этой классификации выделяют три типа лекарственных поражений печени: гепатоцеллюлярное, холестатическое и смешанное.

В наших исследованиях установлен смешанный тип поражения печени при длительном применении преднизалона собакам, когда доминирует гепатоцеллюлярная форма при сочетании с холестатическим эффектом.

По результатам второго этапа исследований установлено, что длительное лечение собак преднизолоном и с дополнительным применением веществ гепатопротекторной направленности предупреждает развитие патологических изменений в печени.

К концу проведенных экспериментов у собак 1 опытной группы при клиническом обследовании болезненность в области печени и увеличение ее размеров отсутствовали, при этом ультразвуковое исследование не выявило значимых патологических изменений в структуре органа. Во 2 опытной группе у 2 собак (20 %) были выявлены признаки поражения печени, тогда как у контрольных животных патология зафиксирована у 7 (70 %) животных.

По динамике биохимических показателей крови животных (табл. 23) можно судить об эффективности гепатотропного лечения – у опытных собак уровень билирубина, АлАТ, АсАТ, ЩФ был в норме, что свидетельствует об отсутствии цитолитического синдрома и холестаза в печени.

Таблица 23 – Влияние гепатопротекторов на биохимические показатели крови собак с лекарственно-индуцированными поражениям печени ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )

Показатели	1 опытная	2 опытная	3 контроль	Норма
АлАТ, Ед/л	52,7±1,3*	57,4±3,3	69,4±1,8	15-58
АсАТ, Ед/л	35,5±2,5*	41,8±3,9	44,7±2,6	16-43
ЩФ, Ед/л	92,9±4,2	95,3±5,7	103,6±3,9	10-100
Общий билирубин, мкМ/л	5,3±0,3	6,1±0,7	7,5±0,5	1,7-10

Примечание: \*– степень достоверности  $p \leq 0,05$  по отношению к контролю

Определение активности аминотрансфераз у контрольных животных показало, что к концу эксперимента средняя концентрация АлАТ по группе составила 69,4±1,8 Ед/л, а АсАТ – 44,7±2,6 Ед/л, что свидетельствует о наличии гиперферментемии у животных. Таким образом, у собак без применения гепатопротекторов, ферментативная активность аминотрансфераз находилась на более высоком уровне, чем у животных опытных групп с достоверной разницей ( $p \leq 0,05$ ) в группе с применением эсвелана на 31,7 % (АлАТ) и 25,9 % (АсАТ). У собак, которым применялся препарат-аналог, разница выявлена на уровне тенденции – по АлАТ на 16,8 % и по АсАТ на 6,9 %. Средний показатель ЩФ у контрольных собак был выше нормы с разницей на уровне тенденции – на 11,5 % по отношению к первой группе животных, и на 8,7 % по отношению ко второй группе.

Таким образом, на проведенное исследование подтверждает данные о том, что длительное применение преднизолона эффективно при терапии артритов, но его побочное действие может приводить к развитию лекарственно-

индуцированного поражения печени, проявляющееся доминантой гепатоцеллюлярной формы при сочетании холестатического эффекта.

С учетом этого животным, получающим длительно преднизолон, необходим контроль за состоянием их печени, который осуществляют с помощью биохимического анализа крови и УЗИ-исследования. При гормональном лечении в качестве терапии сопровождения рационально использовать гепатопротекторы, которые повышают функциональную способность клеток печени к детоксикации и выведению различных ксенобиотических веществ, а также стимулируют регенерацию гепатоцитов. Такими качествами обладает разработанный препарат эсвелан и его курсовое применение в дозе 0,2 мл на 1 кг массы тела оказывает превентивное действие на развитие гепатопатий у собак. Руководствуясь вышеперечисленными параметрами можно адекватно использовать ГКС и достигать желаемого терапевтического эффекта с наименьшим вредоносным воздействием на организм животных [90, 152].

#### **4.5.2 Изучение эффективности эсвелана при гепатозах у собак**

Проведенными нами ранее исследованиями установлено, что в структуре гепатопатий у собак основная доля приходится на гепатоз с приоритетом хронической формы, что согласуется с данными других исследователей [41, 63, 70]. С учетом этого эксперименты по разработке показаний к применению препарата эсвелан проводили при хроническом гепатозе (по типу жировой дистрофии) у собак. Жировой гепатоз (жировая дистрофия, стеатоз печени) – заболевание, характеризующееся накоплением триглицеридов в гепатоцитах и нарушением основных функций печени.

Для исследований методом парных аналогов формировали две группы собак, поступивших на лечение в клинику «Доктор Томас» города курорта Анапы, по 20 животных в каждой. Клиническое обследование животных проводили по общепринятой в ветеринарии схеме. Определяли Status praesens (габитус), изучали состояние волосяного покрова, кожи, видимых

слизистых оболочек, проводили посистемные исследования, а также ультразвуковое изучение состояния гепатобилиарной системы.

Собакам проводили термометрию, подсчитывали количество пульса и дыхательных движений в минуту. При сборе анамнеза учитывали частоту мочеиспусканий, дефекаций, условия содержания и кормления животных. Кровь для лабораторных исследований у собак брали натощак три раза – при постановке диагноза, на 21 и 30 сутки опыта.

При сборе анамнеза было выявлено, что кормление больных собак в большинстве случаев было односторонним и основой рационов являлись высокоуглеродистые корма.

При анализе организации кормления собак кормами промышленного производства установлено, что используются корма низкого качества, возможно с истекшим сроком годности, допускалась резкая смена влажных кормов домашнего приготовления на сухие готовые корма.

Клиническими исследованиями установлено, что при хроническом течении гепатоза внешние проявления патологии были выражены слабо.

Наиболее характерными признаками являлись: снижение аппетита и массы тела; запоры либо поносы; увеличение границ печени при повышении ее чувствительности в области топографических границ; сухость кожного покрова, взъерошенность и тусклость шерсти; в большинстве случаев у животных отмечался зуд, приводящий к расчесыванию и нарушению целостности кожи – алопеции на бедрах, пояснице и у основания хвоста (рис. 25).



Рис. 25 – Расчесывание кожи у собак при гепатозе

У 30 % собак зарегистрирована незначительная иктеричность слизистых оболочек ротовой полости и склер глаз (рис. 26).

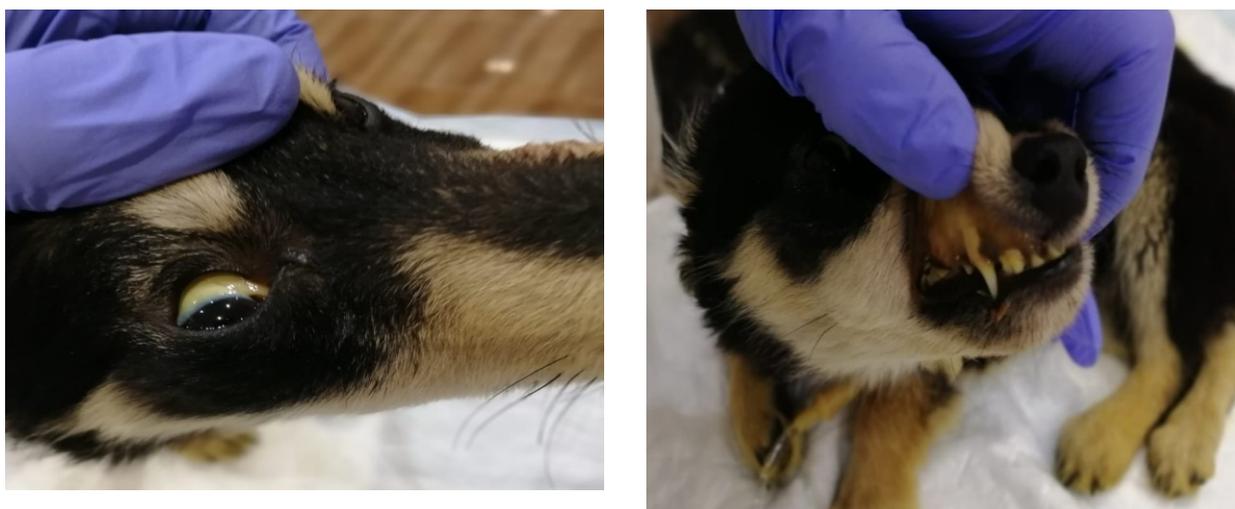


Рис. 26 – Иктеричность слизистых при гепатозе

Значимых изменений от нормы в показателях температуры, пульса и дыхания не выявлено, однако количество дыхательных движений (в среднем по группам) регистрировалось на уровне верхней границы нормы (табл. 24).

Таблица 24 – Клинические показатели собак до лечения ( $M \pm m$ ;  $n=20$ )

Группа	Температура, $^{\circ}\text{C}$	Дыхание, дв/мин	Пульс, уд/мин
Опытная	$38,5 \pm 0,17$	$20,2 \pm 1,8$	$89,7 \pm 2,8$
Контрольная	$38,4 \pm 0,21$	$20,6 \pm 1,4$	$90,1 \pm 2,6$
Норма	37,5-39,0	15-20	70-120

У собак с хроническим течением гепатоза отмечалось незначительное снижение эритроцитов и гемоглобина относительно референсных значений, данные гематологического исследования представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Результаты клинического анализа крови собак до лечения (M±m; n=20)

Группа	Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	Гемоглобин, г/л	СОЭ, Мм/час
Опытная	10,3±0,24	4,9±0,37	108,7±3,2	2,9±0,01
Контрольная	11,2±0,31	5,1±0,44	106,4±2,8	3,1±0,03
Норма	6-17	5,2-8,4	110-170	2,5-3,5

При биохимическом исследовании крови больных собак (табл. 26) зафиксировано повышение активности аминотрансфераз (без ярко выраженной манифестации) – при доминанте АлАТ, что свидетельствует о нарушении целостности гепатоцитов, в результате чего происходит выход ферментов во внеклеточное пространство. Повышение концентрации ЩФ и холестерина свидетельствует о наличии холестатического синдрома у собак и связано с нарушением специфической функции печени трансформировать указанные метаболиты и выводить их с желчью в кишечник.

Таблица 26 – Результаты биохимического анализа крови собак до лечения (M±m; n=20)

Показатели	Опытная	Контрольная	Норма
АлАТ, Ед/л	81,5±4,6	79,7±3,8	15-58
АсАТ, Ед/л	55,7±5,6	57,3±4,7	16-43
ЩФ, Ед/л	118,9±4,6	114,7±5,1	10-100
Холестерин, мм/л	7,2±0,57	6,9±0,48	2,8-6,9
Об. билирубин, мкМ/л	11,3±3,4	10,5±2,5	1,7-10
Пр. билирубин, мкМ/л	2,6±0,01	2,4±0,04	0-2,5
Глюкоза, мм/л	3,1±0,14	2,9±0,26	3,3-5,6
Общий белок, г/л	54,7±2,3	52,8±2,6	55-71
Мочевина, мм/л	3,11±0,09	3,37±0,12	3,5-9,2

При исследовании пигментного обмена у больных гепатозом собак зафиксировано увеличение содержания общего билирубина, что связано с деструкцией печеночных клеток, вследствие чего нарушается экскреция прямого билирубина в желчные капилляры, и он попадает непосредственно в кровь, где содержание его значительно увеличивается, также снижается способность гепатоцитов синтезировать билирубин-глюкорониды, из-за чего количество непрямого билирубина в крови увеличивается.

Нарушение белковосинтезирующей функции печени проявилось в гипопропротеинемии при низком уровне мочевины в сыворотке крови. Изменения в углеводном обмене при нарушении функции печени проявились установленной гипогликемией у больных собак.

Диагностика хронических гепатозов затруднена из-за того, что большинство гепатопатий имеют схожую клиническую картину. Диагноз обязательно должен быть подтвержден ультрасонографией при которой обращают внимание на следующие параметры: качество визуализации; топографическое расположение; контуры и границы органа; эхогенность и эхоструктура печени; подвижность органа; особенность сосудистого рисунка.

УЗИ-диагностику печени собак осуществляли за реберной дугой, зафиксировав животное на спине, в области последних межреберных промежутках левого бока. Для предотвращения асфиксии животных с асцитом, исследования необходимо проводить в положении стоя, сидя или лежа на вентральной брюшной стенке. Желчный пузырь исследовали справа под реберной дугой.

У больных собак изображение паренхимы печени характеризовалось выраженной неоднородностью. Просматривались отдельные мелкие очажки высокой эхогенности, отражающие склерозирование сосудистой стенки гепатоцитов. В структуре паренхимы по видимому полю визуализировались мелкие зернистые участки, чередующиеся с множеством эхонегативных образований, соответствующих расширенным венам и желчным протокам. В неко-

торых случаях выявлялись участки пониженной или повышенной контрастности. При значительной степени жирового гепатоза наблюдали картину «светлой печени». В большинстве случаев (60 %) зафиксирована гепатомегалия, печеночный край увеличен, смазан, в отдельных случаях слегка деформирован, у 25 % собак имеются признаки воспаления жёлчного пузыря.

При проведении экспериментов по разработке показаний к применению препарата эсвелан собак с хронической формой гепатоза лечили комплексно, с некоторыми вариациями в подборе патогенетической терапии, которые нашли отражение в формировании парных аналогов по группам, при этом в качестве гепатопротекторов опытным собакам был назначен эсвелан, а контрольным животным препарат сравнения – коммерческий гепатопротектор гепатовет. Схема опыта представлена в таблице 27.

Таблица 27 – Схема опыта по определению терапевтической эффективности эсвелана при хроническом гепатозе у собак

Группа	Схема лечения
Опытная (n=20)	Диетическое кормление; эсвелан, внутрь 1 или 2 раза в день (с общей суточной дозой 0,2 мл на 1 кг массы тела); по показаниям желчегонные препараты; комплексные витаминные препараты согласно инструкции по применению.
Контрольная (n=20)	Диетическое кормление; гепатовет в дозе 0,1 мл/кг массы тела внутрь за 30 минут до кормления три раза; по показаниям желчегонные препараты; комплексные витаминные препараты согласно инструкции по применению.

В результате проведенных исследований установлено, что общий курс лечения собак с препаратом эсвелан составил  $33,5 \pm 2,5$  суток, а у контрольных аналогов –  $42,0 \pm 5,4$  дня. Улучшение общего состояния, восстановление аппетита в опытной группе начиналось в среднем после 10 дней лечения, а в контроле после двухнедельной терапии. Клинически эффективность лечения проявлялась в прекращении рвоты и диареи, снижался зуд вплоть до полного

прекращения. На пораженных участках кожа подсыхала и покрывалась корочкой, с последующим очищением. К месячному периоду у собак опытной группы в местах алопеций наблюдали активный рост волос. При пальпации болезненность в области печени отсутствовала.

У собак обеих групп при лечении происходила нормализация гематологических показателей, данные представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Динамика гематологических показателей собак при лечении гепатоза ( $M \pm m$ ;  $n=20$ )

Период исследования	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	Гемоглобин, г/л	СОЭ, Мм/час
Опытная – эсвелан				
21 сутки	$8,8 \pm 0,36^{**}$	$5,8 \pm 0,29$	$124,7 \pm 2,1^*$	$2,6 \pm 0,02$
30 сутки	$8,4 \pm 0,23^*$	$6,7 \pm 0,34^*$	$137,8 \pm 3,9^{**}$	$2,5 \pm 0,05$
Контрольная – гепатовет				
21 сутки	$10,4 \pm 0,31$	$5,4 \pm 0,28$	$112,8 \pm 2,7$	$2,8 \pm 0,04$
30 сутки	$9,5 \pm 0,42$	$6,1 \pm 0,56$	$121,9 \pm 2,6$	$2,5 \pm 0,05$
Норма	6-17	5,2-8,4	110-170	2,5-3,5

Примечание: различия достоверны (\* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \geq 0,01$ )

Установлено снижение концентрации лейкоцитов, разница которых в опытной группе на 21 сутки эксперимента относительно контрольных собак составила 18,2 % ( $p \geq 0,01$ ) и на 30 день – 13,1 % ( $p \leq 0,05$ ). Уровень эритроцитов и гемоглобина повышался, при этом разница между опытом и контролем составила: по эритроцитам на 21 сутки – 7,4 % и на 30 – 9,8 % ( $p \leq 0,05$ ); по гемоглобину на 21 сутки – 10,5 % ( $p \leq 0,05$ ) и на 30 – 13 % ( $p \geq 0,01$ ).

Динамика биохимических показателей крови показала более эффективное восстановление структуры и функций печени при использовании в лечении эсвелана (табл. 29).

В целом, применение животным гепатопротекторов вызывало изменения активности ферментов-маркеров состояния печени в сторону нормализации. Активность АЛАТ понизилась в опытной группе на 55,8 % и АсАТ – на 65,1

% по сравнению с первоначальным уровнем, а в контроле на 23,6 % и 27,9 % соответственно.

Таблица 29 – Динамика биохимических показателей собак при лечении гепатоза ( $M \pm m$ ;  $n=20$ )

Показатели	Опытная		Контрольная		Норма
	21 сутки	30 сутки	21 сутки	30 сутки	
АЛАТ, Ед/л	62,7±5,1*	52,3±4,3***	68,4±5,7	60,5±3,5	15-58
АсАТ, Ед/л	45,6±2,9*	39,7±3,4**	49,1±2,1	44,8±5,8	16-43
ЩФ, Ед/л	96,3±5,8	84,3±3,7*	100,5±5,5	92,6±4,4	10-100
Холестерин, мМ/л	6,4±0,18	5,9±0,24	6,8±0,12	6,1±0,22	2,8-6,9
Общий билирубин, мкМ/л	7,3±0,28***	6,7±0,89**	8,9±42	7,5±0,25	1,7-10
Прямой билирубин, мкМ/л	2,1±0,03	1,8±0,01	2,3±0,02	2,1±0,05	0-2,5
Глюкоза, мМ/л	3,8±0,37	4,2±0,26	3,5±0,25	3,9±0,44	3,3-5,6
Общий белок, г/л	59,7±4,8	63,2±2,7*	56,3±3,9	58,5±2,0	55-71
Мочевина, мМ/л	3,62±0,24	4,16±0,32	3,49±0,13	3,95±0,36	3,5-9,2

Примечание: различия достоверны (\* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \geq 0,01$ ; \*\*\*  $p \geq 0,001$ )

При расчете разницы между группами она составила: по АЛАТ на 21 сутки 9,1 % ( $p \leq 0,05$ ) и на 30 – 15,7 % ( $p \geq 0,001$ ); по АсАТ на 21 сутки 7,7 % ( $p \leq 0,05$ ) и на 30 – 12,8 % ( $p \geq 0,01$ ).

По показателям желчеобразования у всех животных в процессе лечения отслеживалась положительная динамика выздоровления. Активность ЩФ понизилась в опытной группе на 41,1 % и холестерина – на 22 % по сравнению с первоначальным уровнем, а в контроле на 23,8 % и 13,1 % соответственно. При расчете разницы между группами она составила: по ЩФ на 21 сутки 4,4 % и на 30 сутки – 9,8 % ( $p \leq 0,05$ ); по холестерину на 21 сутки 6,2 % и на 30 сутки – 3,4 %. Концентрация билирубина в процессе лечения снизилась и регистрировалась в границах нормы для животных данного вида. Максимально выраженные изменения выявлены в первом периоде эксперимента,

так как на 21 сутки разница в содержании общего билирубина между группами составила 21,9 % ( $p \geq 0,001$ ) и к концу опыта – 11,8 % ( $p \geq 0,01$ ).

Уровень глюкозы у собак обеих групп динамично повышался и уже в первом периоде опыта достиг параметров нормы с разницей от фоновых данных 22,6 % (опыт) и 20,7 % (контроль), что свидетельствует о положительной тенденции в восстановлении гликогенсинтезирующей функции печени.

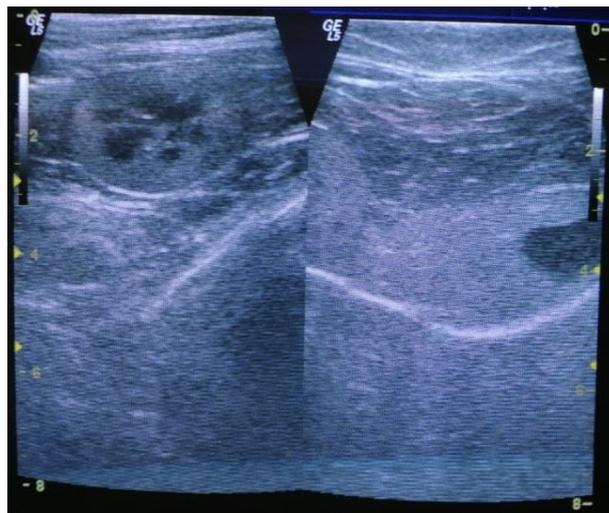
Примененное лечение привело к улучшению протенсинтетической функции печени, что отразилось на показателях протеинового спектра сыворотки крови собак. Результатами биохимических исследований установлено, что у животных обеих групп (с приоритетом по опытной группе) произошло возрастание уровня общего белка относительно исходных значений. Так, за период эксперимента количество общего белка в опытной группе увеличилось на 15,5 % , а в контрольной – на 10,8 %. При этом отмечена прямая зависимость между содержанием белка и конечного продукта белкового обмена – мочевины, концентрация которой увеличилась на 33,7 % (опыт) и на 17,2 % (контроль), что может говорить о достаточном уровне пластических реакций в организме собак.

К концу лечения у собак опытной группы при ультразвуковом исследовании не установлено значимых патологических изменений в структуре органа – эхогепатограмма мелкозернистая, гомогенная и состоит из большого количества мелких, слабой интенсивности эхосигналов.

Сосудистый рисунок представлен большим количеством печеночных вен, которые визуализируются как эхонегативные образования. В контрольной группе у 7 собак (35 %) были выявлены остаточные признаки поражения печени (рис.27).



Пример 1 – из опытной группы



Пример 2 – из контрольной группы

Рис. 27 – УЗИ печени собак при терапии гепатоза

Таким образом, включение в схему комплексной терапии хронического жирового гепатоза у собак разработанного препарата эсвелан способствует более эффективной терапии больных животных за счёт улучшения клинического статуса, оптимизации гематологических и биохимических показателей, нормализации протеинсинтетической, пигментообразовательной и детоксикационной функций печени. Применение гепатопротектора эсвелан обеспечивает более быстрое выздоровление животных (в среднем на  $8,5 \pm 1,5$  дней), относительно препарата сравнения [148, 154].

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современной ветеринарии в структуре заболеваний животных значительную долю занимают патологии гепатобилиарной системы. Гепатопатии у животных развиваются при малоподвижном содержании и неполноценном кормлении. Одной из наиболее распространенных причин данных заболеваний является воздействие гепатотоксических агентов, к которым относятся многие лекарственные препараты, микотоксины и др. (Никулин И.А. с соавт., 2018; Кузьминова Е.В. с соавт., 2017; Парк Д.В., 1973).

Мониторинговыми исследованиями по изучению распространения и структуры заболеваний печени у собак, проведенных в период 2016-2017 гг., на базе ветеринарных клиник города-курорта Анапы Краснодарского края и города Советская Гавань Хабаровского края установлено, что в структуре незаразной патологии у собак лидирующее место принадлежит болезням печени и органов пищеварения – от 49 до 52 %. Наиболее часто гепатопатии регистрировались у собак в возрасте от 8 лет и старше, при этом пик заболеваемости приходится на период 9-10 лет. В структуре заболеваний печени преобладали гепатозы 49-54 %, гепатиты регистрировались в 30-33 % случаев, очаговые заболевания печени 4-11 % и прочие патологии печени составляли 7-12 %. В курортной зоне Черноморского побережья Кавказа выявлено, что значимой долей в патологии печени у собак являются гепатопатии регистрирующиеся при пироплазмозе. При этом тяжелее всего переносят заболевание и имеют сопутствующее поражение печени шарпеи, чау-чау, кавказские и среднеазиатские овчарки.

При анализе этиологических факторов гепатопатий у собак выявлено, что одной из основных причин возникновения патологии печени является неправильно подобранная схема кормления животного. Длительный дисбаланс элементов питания, их дефицит или избыток, нарушение усвояемости в зависимости от наличия отрицательных компонентов рациона, неспособность ор-

ганизма к восприятию поступающих питательных веществ, нарушение пищеварения – сопровождается дистрофическими процессами в печени.

Также распространен инфекционный этиологический фактор, ведущий к развитию печеночной недостаточности: гепатиты вирусной природы (вирусный гепатит, чума, парвовирусный энтерит и др.); реже спирохеты, риккетсии, пироплазмы и др.

При этом результатами собственных исследований подтверждены данные о том, что в современной медицине проблема лекарственной гепатотоксичности приобретает особую значимость, убедительным свидетельством чего является частота регистрируемых побочных эффектов у различных лекарственных средств (в собственных исследованиях – длительное применение преднизолона).

Таким образом, на основе проведенных исследований выявлено, что независимо от климатической зоны, отмечена положительная тенденция к увеличению количества заболеваний печени у собак, при этом в структуре гепатопатий основная доля приходится на гепатоз.

При многообразии этиопатогенетических механизмов развития патологических процессов в печени ключевые звенья патогенеза по большей части универсальны, что позволяет использовать схожее лечение гепатопатий. Основу терапии должны составлять лекарственные средства с направленным действием на гепатоциты, имеющие общее название «гепатопротекторы». К наиболее перспективным веществам, отвечающим требованиям современной гепатологии, можно отнести фосфолипиды и антиоксиданты (С.В. Оковитый с соавт., 2010; С.В. Козлов с соавт., 2015).

С учетом этого в отделе фармакологии Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института был разработан препарат эсвелан, включающий вещества с гепатопротекторной и антиоксидантной активностью.

Выбор оптимального состава эсвелана проводили методом биотестирования на модели с *Paramecium caudatum* в отношении антиоксидантного и мембранотропного действия композиций антиоксидантов и фосфолипидов, на основании этих данных состав эсвелана включает в 1 мл: лецитин (в пересчете на фракцию PPh) – 100 мг; метионин – 30 мг; силимарин (в пересчете на силибинин) – 20 мг; дигидрокверцетин – 2 мг; вспомогательные вещества (Na-КМЦ, вода очищенная, спирт этиловый не более 1,0 %) – остальное.

Основой препарата являются лецитины, вырабатываемые из растительных масел – подсолнечных, соевых, рапсовых в соответствии с ГОСТ 32052 – 2013. Предпочтительнее использовать рапсовые лецитины, которые обладают наиболее выраженными фармакологическими свойствами: гепатопротекторными, мембранопротекторными, радиопротекторными, иммуномоделирующими и др. (Корнен Н.Н., 2017).

Фармакологический эффект эсвелана определяется свойствами входящих в него веществ, при этом каждый из компонентов выполняет определенную функцию, дополняя и усиливая свойства другого.

Введение в эмульсию аминокислоты – метионина, обеспечивает, кроме фармакодинамического воздействия, стабильность реологических параметров эмульсии, не допуская ее разделение на фракции (стабильность эмульсии возникает за счет цвиттерионных свойств молекулы аминокислоты). Дополнительно дигидрокверцетин, являясь мощным антиоксидантом, также защищает от окисления фосфолипиды препарата и обеспечивает структурную устойчивость липидных составляющих. Такие эмульсии сохраняют свой состав и свойства в широком диапазоне кислотности от 3,0 до 10,0 рН и выдерживает нагрев до 65° С в течение часа.

Лекарственная форма препарата эсвелан – гель. Различия в физико-химических свойствах (растворимость) активных ингредиентов разрабатываемого перорального препарата предопределили сложную микрогетерогенную систему и технологию геля, содержащего суспензию и эмульсию действующую

щих веществ. Так, дисперсионной средой в данной лекарственной форме выступает вода очищенная. В качестве гидрофильной основы была выбрана натриевая соль эфира целлюлозы и гликолевой кислоты (натрий-КМЦ). Подготовку суспензионной составляющей осуществляли методом диспергирования с вспомогательной жидкостью, готовили пульпу дигидрокверцетина и силимарина, используя в качестве вспомогательной жидкости 60 %-ный спиртовой раствор в соотношении 1:1. В пульпу порционно, тремя равными частями, вводили фосфолипидный комплекс, при этом гомогенизировали полупродукт при каждом введении фосфолипидов.

По физико-химическим свойствам препарат эсвелан должен быть однородной консистенции, от желто-коричневого до коричневого цвета и не иметь прогорклого запаха, а также признаков физической нестабильности (агрегации частиц, фазового расслоения, коагуляции). Экспериментально установлен срок годности препарата эсвелан – 1,5 года со дня изготовления.

Токсикометрические показатели эсвелана изучались на различных видах лабораторных животных и собаках с целью выявления безопасности его применения в ветеринарной практике. В ходе изучения общетоксических свойств эсвелана установлено, что при однократном пероральном введении его нелинейным крысам и собакам в диапазоне доз от 940 до 15900 мг/кг массы тела токсический эффект не установлен. При этом среднесмертельная доза ( $LD_{50}$ ) препарата в остром опыте выявлена не была. Следовательно, препарат эсвелан в соответствии с нормативами ГОСТ 12.1.007-76 относится к 4 классу опасности – вещества малоопасные.

Результаты исследований при длительном введении эсвелана нелинейным крысам в дозах, составляющих 1/10, 1/20 и 1/50 от максимально испытанной в остром опыте, не выявили токсического воздействия препарата на организм лабораторных животных. При этом эсвелан оказывает опосредованное положительное действие на ряд биохимических показателей крови,

стимулируя белковый и липидный обмен. Кроме того препарат проявляет ростостимулирующее действие.

Экспериментально доказано отсутствие у эсвелана местного раздражающего действия, а также эмбриотоксического и тератогенного эффекта.

При изучении фармакологических свойств эсвелана на модели лекарственно-индуцированного поражения печени лабораторных животных, вызванного введением крысам внутрижелудочно тетрациклина гидрохлорида в форме суспензии с Tween-80 (1:10) в дозировке 0,5 г/кг массы тела один раз в сутки в течение недели и параллельном применении эсвелана в разных дозах установлено, что моделирование токсического поражения печени у животных привело к развитию деструкции гепатоцитов. Так, у крыс происходило возрастание концентрации аминотрансфераз, что свидетельствует о повреждении гепатоцитов и выходе внутриклеточных субстанций в кровь. Данный процесс сопровождается внутрипеченочным холестазом и нарушением протеинсинтетической функции печени. Тогда как применение гепатопротектора эсвелана приводило к улучшению параметров биохимических констант гомеостаза и функционального состояния печени подопытных крыс на фоне токсического поражения.

Анализ полученных данных свидетельствует о наличии у препарата эсвелан антиоксидантных свойств, что проявилось в снижении концентрации продуктов липопероксидации в опытных группах в сравнении с крысами без лечения, что согласуется с существующими представлениями о механизмах антиоксидантного действия компонентов препарата, таких как фосфолипиды, силимарин и дигидрокверцетин (Башкирова Е.В. с соавт., 2014; Буеверов А.О. с соавт., 2008; Козлов С.В. с соавт., 2015).

Проведенные гистологические исследования подтвердили эффективность эсвелана при тетрациклиновом повреждении печени у крыс, при этом лучший результат получен во второй и третьей опытных группах, где эсвелан применялся в дозах 0,2 и 0,3 мл/кг массы тела. С учетом полученных данных

в дальнейших экспериментах терапевтическая доза препарата составляла 0,2 мл/кг массы тела.

При изучении фармакодинамических эффектов эсвелана на модели острого токсического экспериментального тетрахлорметанового гепатита у крыс гепатозащитная активность препарата проявилась восстановлением нарушенной функциональной активности печени и снижением синдрома цитолиза гепатоцитов у опытных животных. Развитие интоксикации у животных сопровождалась усилением процессов ПОЛ, что подтвердилось увеличением всех продуктов липопероксидации. При этом выявлено, что фармакологическое действие эсвелан оказывает на метаболическом уровне, проявляя антиоксидантные свойства при затравке  $CCl_4$ . Учитывая то, что при интоксикации тетрахлорметаном происходит избыточная генерация свободных радикалов, которые образуются при процессе метаболизма с влиянием системы цитохрома P-450. В клетках свободные радикалы выступают в качестве индукторов липопероксидации и при взаимодействии с ненасыщенными жирными кислотами отсоединяют у них атом водорода, и соответственно опять образуются липидные перекислы, которые инициируют каскад цепных реакций с повышенной генерацией продуктов липопероксидации. При этом характерные поражения выявляются в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, что отражается на активности внутриклеточных ферментов и приводит к снижению детоксикационной функции печени, а также оказывает ингибирующее действие на процессы биосинтеза белка, вызывая разрушение РНК, разобщение процессов окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания (Еремина Е.Ю., 2012; Свиридов М.М., 2006; Alhassan A.J. et al., 2009).

Специфическая активность эсвелана проявилась повышением сохранности животных опытных групп, улучшением их клинического статуса и динамики массы тела относительно контроля. Применение эсвелана сопровождалось снижением процессов свободнорадикального окисления, нормализа-

цией биохимических показателей при повышении стабильности структур поврежденных органов. При патологоанатомическом исследовании у крыс группы без лечения установлены патологические изменения, проявляющиеся, в разной степени увеличением печени в размерах, ее дряблостью, изменением цвета, неоднородностью окраски, закруглением краев. Применение эсвелана снижало степень интоксикации организма, поскольку макроскопические изменения в печени животных, получавших лечение, были менее выражены – цвет близок к нормальному, консистенция упругая, края закруглены незначительно.

Таким образом, эсвелан обладает выраженными гепатопротективными свойствами, способствующими снижению общего токсического, цитолитического и холестатического проявлений повреждающего действия тетрахлорметана.

В рамках проводимых исследований изучалось состояние печени у собак при длительном применении преднизолона и оценка эффективности эсвелана при лекарственно-индуцированном поражении печени собак.

В результате проведенных опытов установлено, что при оценке состояния собак, длительный период получавших преднизолон, у всех животных зарегистрирован положительный эффект в терапии иммуно-опосредованного артрита. Но у 48 % собак при пальпации границ печени выявлена умеренная гепатомегалия, без значительной болезненности. Также при ультразвуковой диагностике установлены патологические изменения в печени – воспалительного характера (16 % случаев) и дистрофического (32 % случаев).

При биохимическом анализе в крови у собак, с признаками патологических процессов в печени наблюдались изменения, указывающие на гепатоцеллюлярную утечку и холестаза. При этом установлен смешанный тип поражения печени при длительном применении глюкокортикостероидов собакам, когда доминирует гепатоцеллюлярная форма при сочетании с холестатическим эффектом. По результатам второго этапа исследований установлено,

что лечение собак с преднизолоном и дополнительным применением веществ гепатопротекторной направленности предупреждает развитие патологических изменений в печени. Курсовое применение эсвелана собакам в дозе 0,2 мл на 1 кг массы тела 1 раз в сутки в качестве средства сопровождения способно корректировать побочное действие глюкокортикоидов. Разница между опытной и контрольной группами по количеству установленных гепатопатий составила 38,3 %.

При лечении хронического гепатоза собак установлено, что общий курс терапии с препаратом эсвелан составил  $33,5 \pm 2,5$  суток, а у контрольных аналогов с препаратом сравнения  $42,0 \pm 5,4$  дня. Улучшение клинического состояния в опытной группе начиналось в среднем после 10 дней лечения, а в контроле после двухнедельной терапии. У собак обеих групп к концу лечения происходила нормализация гематологических показателей: снижение концентрации лейкоцитов, разница которых в опытной группе на 21 сутки эксперимента относительно контрольных собак составила 18,2 % ( $p \geq 0,01$ ) и на 30 день – 13,1 % ( $p \leq 0,05$ ); уровень эритроцитов и гемоглобина повышался, при этом разница между опытом и контролем составила по эритроцитам на 21 сутки – 7,4 % и на 30 – 9,8 % ( $p \leq 0,05$ ), а по гемоглобину на 21 сутки – 10,5 % ( $p \geq 0,05$ ) и на 30 – 13 % ( $p \geq 0,01$ ). Динамика биохимических показателей крови показала более эффективное восстановление структуры и функций печени при использовании в лечении эсвелана, поскольку активность АлАТ снизилась в опытной группе на 55,8 % и АсАТ на 65,1 % по сравнению с первоначальным уровнем, а в контроле на 23,6 % и 27,9 % соответственно. В опытной группе содержание понизилось ЩФ на 41,1 % и холестерина на 22 % по сравнению с первоначальным уровнем, а в контроле на 23,8 % и 13,1 %, при этом происходила динамичная нормализация протеинсинтетической и пигментообразовательной функции печени с максимальным проявлением у собак опытной группы. К концу лечения эсвеланом у собак при ультразвуковом исследовании не установлено значимых патологических изме-

нений в структуре органа, а у 35 % контрольных животных были выявлены остаточные признаки поражения печени.

Учитывая данные литературы и опираясь на полученные нами результаты исследований, можно предположить, что действие фосфолипидов на различные звенья патологического процесса в гепатоцитах вносит значительный вклад в гепатопротекторные свойства эсвелана. Рассматривая возможные механизмы гепатопротекторного действия других компонентов препарата, нельзя обойти вниманием изученное антиоксидантное действие их комбинации, что и подтвердилось в наших экспериментах.

Таким образом, проведенные исследования послужили основой для обоснования состава препарата эсвелан и позволили получить данные о его влиянии на морфо-функциональный статус печени и состояние метаболических процессов в организме животных. Совокупный анализ полученных результатов свидетельствует о том, что эсвелан является эффективным лекарственным средством для лечения гепатозов собак и снижения побочных эффектов при назначении гепатотоксичных препаратов.

С учетом указанных выше исследований разработана и утверждена временная инструкция по применению препарата эсвелан.

## 6. ВЫВОДЫ

1. При изучении распространения и структуры заболеваний печени у собак, проведенных в период 2016-2018 гг. на базе ветеринарных клиник города-курорта Анапы Краснодарского края и города Советская Гавань Хабаровского края установлено, что в структуре незаразной патологии у собак лидирующее место принадлежит болезням печени и органов пищеварения – от 49 до 52 %. В структуре заболеваний печени преобладают гепатозы – 49-54 %, гепатиты регистрируются в 30-33 % случаев, очаговые заболевания печени – в 4-11 % и прочие патологии печени – в 7-12 %. Наиболее часто гепатопатии у собак развиваются в возрасте от 8 лет и старше, при этом пик заболеваемости приходится на период 9-10 лет.
2. Разработан гепатопротекторный препарат эсвелан, содержащий в 1 мл: лецитин (в пересчете на фракцию PPh) – 100 мг; метионин – 30 мг; силимарин (в пересчете на силибинин) – 20 мг; дигидрокверцетин – 2 мг; вспомогательные вещества – остальное.
3. Эсвелан при однократном пероральном введении нелинейным крысам и собакам в диапазоне доз от 940 до 15900 мг/кг массы тела не вызывает гибели и токсикоза у животных, что классифицирует его как малотоксичный препарат и по ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества» он относится к 4-му классу опасности (малоопасные вещества). Результаты проведенных хронических экспериментов свидетельствуют о том, что длительное применение эсвелана в токсичных дозах не оказывает негативного воздействия на клиническое состояние животных и морфо-биохимические показатели крови, а отсутствие макроскопических и гистологических изменений в органах и тканях свидетельствует об отсутствии токсической нагрузки на организм животных. Эсвелан не проявляет местно-раздражающего, эмбриотоксического и тератогенного действия.
4. Фармакологические свойства эсвелана, изученные на лабораторных животных при экспериментальном моделировании поражения печени – тет-

рациклином и тетрахлорметаном, проявляются в улучшении клинического статуса крыс, повышении их сохранности и динамики массы тела на 6,9-12,7 %. Применение эсвелана приводит к снижению в крови концентрации продуктов перекисного окисления липидов: ДК – в 1,5-2,3 раза; КД – в 1,4-1,8 раз; МДА – в 1,4-1,6 раз. Фармакодинамика эсвелана характеризуется увеличением уровня общего белка на 10-12 %, оптимизацией уровня гепатоиндикаторных ферментов – снижение АлАТ на 37,7-43,6 % и АсАТ на 27,8-38,7 %, а также нормализацией показателей углеводного и пигментного обменов, при повышении стабильности структур поврежденных органов. Установлено, что наиболее эффективно применение эсвелана в дозе 0,2 мл/кг массы тела животного.

5. Изучение состояния печени у собак при длительном применении глюкокортикоидов показало, что побочное действие преднизолона при продолжительном использовании может привести к лекарственно-индуцированному поражению печени с доминантой гепатоцеллюлярной формы при сочетании с холестатическим эффектом. Эффективность терапии лекарственно-индуцированных поражений печени у собак при включении в схему эсвелана повышается на 38,3 %.

6. При лечении хронического жирового гепатоза у собак установлено, что применение эсвелана снижает общий курс терапии на 8,5 дней, нормализует гематологические показатели, при снижении концентрации лейкоцитов на 18,2 %, повышении эритроцитов на 9,8 % и гемоглобина на 13 %. Динамика биохимического профиля крови собак показала эффективное восстановление структуры и функций печени при использовании в лечении эсвелана – активность АлАТ снизилась на 55,8 % и АсАТ – на 65,1 %, ЩФ – на 41,1 % и холестерина на 22 %, при нормализации протеинсинтетической и пигментообразовательной функции печени, а также структуры органа.

## **7. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Для практической ветеринарии предложен новый препарат эсвелан, обладающий гепатопротекторными и детоксикационными свойствами.

Эсвелан назначают собакам при гепатопатиях внутрь индивидуально 1 или 2 раза в день с общей суточной дозой 0,2 мл на 1 кг массы тела. Курс применения составляет 30 дней, в зависимости от индивидуальных особенностей организма и характера течения заболевания. При необходимости прием препарата можно возобновить через 2 недели.

Применение эсвелана регламентируется инструкцией по применению от 15.03.2019 г. Производство опытных партий препарата осуществляется в отделе фармакологии Краснодарского НИВИ и ООО «ВКДЦ» (г. Краснодар).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абдуллаев Ш.М. Токсическая гепатодистрофия поросят /Ш.М. Абдуллаев //Ветеринария. – 1985. – №2. – С. 61-68.
2. Алехин Ю.Н. Болезни печени у высокопродуктивных коров (диагностика, профилактика и терапия) /Ю.Н. Алехин //Ветеринария. – 2011. – № 6. – С. 6-11.
3. Антипов В.А. Повышение сохранности и продуктивного здоровья импортного скота /В.А. Антипов, М.П. Семенов, Н.Ю. Басова, А.Н. Турченко и др. //Методические рекомендации. – Краснодар. – 2009. – 62 с.
4. Антипов В.А. Эффективные зооветеринарные технологии по повышению воспроизводства, сохранности и продуктивности животных (методические указания) /В.А. Антипов, А.Н. Турченко, В.В. Меньшенин и др. //Краснодар. – 2005. – С. 42-43.
5. Арчаков А.И. Восстановление фосфолипидами мембран микросом, поврежденных Fe-аскорбатзависимым перекисным окислением липидов /А.И. Арчаков, Е.А. Бородин //Биологические науки. – 1986. – № 7. – С. 30-35.
6. Бабак О.Я. Лекарственные поражения печени: вопросы теории и практики /О.Я. Бабак //Травень. – 2008. – № 4 (120). – С. 83-88.
7. Бабкина, Т.Н. Диагностика и терапия панкреатита у собак /Т.Н. Бабкина, Л.П. Миронова, Н.В. Ленкова //В сборнике: Актуальные проблемы и методические подходы к диагностике, лечению и профилактике болезней животных материалы международной научно-практической конференции. – пос. Персиановский. – 2019. – С. 17-23.
8. Байматов В.Н. Гепатозы продуктивных животных и их профилактика /В.Н. Байматов //Учебное пособие. – Уфа. – 1990. – С. 5-110.
9. Байматов, В.Н. Метаболизм у коров с нарушением функции печени /В.Н. Байматов //Ветеринария. – 1982. – № 8. – С. 50-52.
10. Баранов, Н.П. Диагностическое значение определения изоферментов аспаратаминотрансферазы, малатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, ал-

когольдегидрогеназы и холинэстеразы в сыворотке крови при заболеваниях печени: автореф. дисс. канд. вет. наук: 16.00.01 / Баранов Николай Петрович. – М., 1984. – 22 с.

11. Башкатова, Н.А., Терапевтическая эффективность гепатопротекторов при гепатите у собак /Н.А. Башкатова, Л.П.Миронова //В сборнике: Актуальные проблемы и методические подходы к диагностике, лечению и профилактике болезней животных материалы международной научно-практической конференции. – пос. Персиановский. – 2019. – С. 31-36.

12. Башкирова, Е.В. Изучение фармакодинамических параметров лекарственной формы на основе флаволигнанов расторопши пятнистой (*Silybum marianum* (L.) Gaerth) /Е.В. Башкирова, С.Н. Путина, А.А. Волков и др. //Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова». – 2014. – № 2 – С. 6-10.

13. Беликов, В.В. Оценка содержания флаволигнанов в плодах *Silybum marianum* (L.) /В. В. Беликов //Растительные ресурсы. – 1985. – Вып. 21. – №3. – С.350-358.

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. Блюгер, А.Ф. Практическая гепатология /А.Ф. Блюгер, И.Н., Новицкий //Рига: Звайне, 1984. – 256 с.

16. Блюгер, А.Ф. Тайны и парадоксы печени /А.Ф. Блюгер. //М.: Знание, 1988. – 221 с.

17. Болданова, Н.Б. Защитные действия фосфатидилхолиновых липосом при экспериментальном токсическом гепатите /Н.Б. Болданова, О.В. Добрынина, В.Л. Мигушина //Вопросы мед химии. – 1986.– № 42. – С. 65-67.

18. Ботанико-фармакогностический словарь: Справочное пособие /Под. ред. К.Ф. Блиновой, Г.П. Яковлева //М.: Высшая школа. – 1990. – С. 229-230.

19. Буеверов, А.О. Место гепатопротекторов в лечении заболеваний печени /А.О. Буеверов //Болезни органов пищеварения. – 2001. – № 1. – С. 16-18.
20. Буеверов, А.О. Эссенциальные фосфолипиды в комплексной терапии стеатогепатита смешанного генеза /А.О. Буеверов, В.С. Ешану, М.В. Маевская и др. //Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2008. – № 1. – С. 17-22.
21. 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.
22. Быков, В.А. Технологические, аналитические и фармакоэкономические аспекты, исследования плодов расторопши пятнистой /В.А. Быков, В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная и др. //Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности: материалы докл. междунар. науч. конф. – Томск, 2000. – С. 210-212.
23. Венгеровский, А. И. Гепатозащитное действие силибинина при экспериментальной интоксикации  $CCl_4$  /А.И. Венгеровский, В.С. Чучалин, Е.А. Морокова, Т.П. Прищеп, А.С. Саратиков //Фармакология и токсикология, 1987. – Т. 50 – № 5. – С. 67-69.
24. Венгеровский, А.И. Доклиническое изучение гепатозащитных средств: методические рекомендации /А.И. Венгеровский, И.В. Маркова //Ведомости фарм. комитета. – 1999. – С. 10-24.
25. Винницкая, Е.В. Фиброз печени: возможности обратного развития /Е.В. Винницкая, Ю.М. Юнусова //Фарматека.– 2012. – № 13. – С. 74-76.
26. 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.

27. Волоцуева, А.В. Фармакогностические аспекты исследования плодов расторопши пятнистой /А.В. Волоцуева //Тез. докл. II Междунар. конф. молодых ученых. – Курск. – 2001. – С. 48.
28. Волоцуева, А.В. Фитохимическое исследование по созданию гепатопротекторных лекарственных средств на основе плодов расторопши пятнистой: дис. к. фарм.наук: 15.00.02 /Волоцуева Алла Валериевна. – Пермь, 2004. – 140 с.
29. 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.
30. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений /В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука. Сиб. отделение. – 1990. – 333 с.
31. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений /В.П. Георгиевский //Новосибирск: Наука. – 1990. – 352 с.
32. Голиков, П.Д. Парадоксы печени //М.: Медицина. – 2004. – 115 с.
33. 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.
34. Гордиенко, А.Д. Гепатопротекторный механизм действия флавоноидов /А.Д. Гордиенко //Фармация. – 1990. – Т. 39, №3. – С. 75-78.
35. Губергриц, Н.Б. Фармакотерапевтические эффекты и клинические возможности эталонного препарата силимарина /Н.Б Губергриц П.Г. Фоменко, Г.М. Лукашевич, О.А. Голубова //Фарматека – 2012.– №.2. – С.24–31.
36. Давыдов В.Ф. Виды побочного действия лекарственных средств и их классификация /В.Ф. Давыдов //Фармакология и токсикология. – 1980. – Т.43. – №6. – С.652-661.

37. 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.
38. Дегтярева, И.И. Обоснование применения гепабене для лечения больных с хроническими гепатитами токсической этиологии и жировой дистрофии печени в сочетании с хроническими заболеваниями желчного пузыря /И.И. Дегтярева, Г.В. Оседло и др. //Гастроэнтерология. – 2001. – № 23. – С. 51-54.
39. Демина, Н.Б. Фармакотерапия заболеваний гепатобилиарной системы /Н.Б. Демина и др. //Российский медицинский журнал – 2007. – № 2. – С. 43–46.
40. Денисенко В.Н. Диагностика и лечение болезней печени у собак: учебное пособие для студентов вузов //М.: Колосс, 2006. – 61 с.;
41. Денисенко, В.Н. Диагностика, лечение и профилактика болезней печени у животных /В.Н. Денисенко: Лекция. //М.: МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2002. – 50 с.
42. Десятник, В.И. Морфофункциональное состояние печени и цитохимические показатели крови бычков при гепатозе /В.И. Десятник //Актуальные проблемы интенсификации животноводства и подготовки специалистов: Мат. науч. конф. – Троицк, 1990. – С. 81-82.
43. 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.
44. Драник, Л.И. Фенолкарбоновые кислоты семян расторопши /Л.И. Драник, Л.Г. Долганенко //Исследования по изысканию лекарственных средств природного происхождения: Тез. докл. Всесоюз. конф. – 1981. – С.18.
45. Драпкина, О.М. Неалкогольная жировая болезнь печени – современный взгляд на проблему /О.М. Драпкина, В.И. Смирин, В.Т. Ивашкин //Лечащий врач. – 2010. – № 5. – С. 57.

46. Дружинина, Э.И. Свободные аминокислоты сыворотки крови при заболеваниях желчных путей /Э.И. Дружинина //Вопр. охраны матер. и детства. – 1980. – Т.25, №4. – С. 71-74.
47. Душкин, Е.В. Жировая дистрофия печени у молочных коров (Методическое пособие) /Е.В. Душкин. – Краснодар. – 2012. – 28 с.
48. Душкин, Е.В. Физиолого-биохимическое обоснование лабильности липидно-углеводного метаболизма и его коррекции у крупного рогатого скота: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.04 /Душкин Евгений Васильевич. – Орловский государственный аграрный университет. – 2009. – 37 с.
49. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и научной целью (ETS № 123, Страсбург, 18.03.1986). <http://docs.cntd.ru/document/901909691>
50. Енгашев, С.В. Изучение фармакодинамических параметров лекарственной формы на основе флаволигнанов расторопши пятнистой (*silybum marianum* (L.) Gaertn) /С.В. Енгашев, Е.В. Башкирова, С.Н. Путина, А.А. Волков, С.В. Козлов и др. //Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2014. – № 2. – С. 6-9.
51. Еремина, Е.Ю. Лекарственные поражения печени /Е.Ю. Еремина //Гастроэнтерология Санкт-Петербурга. – 2012. – № 1. – С. 6–25.
52. Жаров, А.В. Патологическая анатомия сельскохозяйственных животных /под ред. Шишкова В.П. и Жарова А.В. учебник для вузов //М.: Колос, 2001. – с 247.
53. Журавлева, М.В. Эслидин – новое средство в терапии диффузных заболеваний печени /М.В.Журавлева //Consilium Medicum. – 2009. – №8. – С.69-72.
54. Зайцев, С.Ю. Биохимия животных. Фундаментальные и клинические аспекты /С.Ю. Зайцев, Ю.В. Конопатов //СПб.: Лань. – 2004. – 271–272 с.
55. Западнюк, В.И. Аминокислоты в медицине /В.И. Западнюк, Л.П. Купраш, М.С. Заика //Киев: Здоров'я. – 1982. – 200 с.

56. Запесочная, Г.Г. О флавоноидах некоторых лекарственных растений /Г.Г. Запесочная, А.И. Баньковский //Тр. ВНИИЛР.– М., 1969. – Т. XV. – С. 629-640.
57. Зарубаев, В.В. Противовирусные препараты на основе биологически активных веществ из древесины лиственницы /В.В. Зарубаев, Л.А.Остроухова, Е.Н. Медведева и др. //Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. – 2010. – №1 (71). – С. 76–80.
58. Звенигородская, Л.А. Применение гепатопротекторов в лечении неалкогольной жировой болезни печени /Л.А. Звенигородская, Е.А. Черкашова //Фарматека. – 2011. – № 15. – С. 58-63.
59. Игumenьцева, В.В. К обоснованию исследования токсикологических и терапевтических свойств дигидрокверцетина /В.В. Игumenьцева Г.Г., Юшков //Сборник научных трудов Ангарского государственного технического университета. – 2007. – Т. 1. № 1. – С. 199-203.
60. Ипатова, О.М. Фосфоглив: механизм действия и применение в клинике /О.М. Ипатова //М.: Изд. ГУ НИИ биомед. Химии РАМН, 2005. – 318 с.
61. Казимирко, В.К. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия /В.К. Казимирко, В.И. Мальцев, В.Ю. Бутылин, Н.И. Горобец //МОРИОН, Киев. – 2004. – 160 с.
62. 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.
63. 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.
64. Карташова, О.Я. Функциональная морфология печени /О.Я. Карташова, Л.А. Максимова //СПб.: Тригон. – 2000. – 118 с.

65. Кесарева, Е.А. Биохимические показатели сыворотки крови собак при болезнях печени /Е.А. Кесарева, В.Н. Денисенко //Ветеринария. – 2004. – №3. – С. 48-50.
66. Климович, И.И. Аминокислоты в лечении билиарной патологии /И.И. Климович, Е.М.Дорошенко, В.П. Страпко, В.Ю.Смирнов //Журнал ГрГМУ. – 2008. – № 1. – С 14-20.
67. Ковалев, И.Е. L-аргинин-содержащий низкомолекулярный иммуностимулирующий фрагмент иммуноглобулина G как прямой регулятор цитохрома P-450 и возможный протектор его от оксида азота /И.Е. Ковалев, Н.В. Шипулина //Хим.-фарм. журн. – 2001. – № 1. – С. 3–6.
68. Козлов, С.В. Изучение некоторых фармакобиологических свойств препарата на основе коллоидного селена, конъюгированного с флавоноидами расторопши пятнистой /С.В. Козлов, А.А. Курилова и др. //Научная жизнь. – 2015. – № 2. – С. 115-124.
69. Козлов, С.В. Состояние углеводного обмена при деструктивно-дистрофическом поражении печени у собак /А.А. Волков, С.А. Староверов, С.В. Козлов и др.//Ветеринарная медицина XXI века. Инновации, обмен опытом и перспективы развития: Материалы Международной науч.-практ. конф.. – Саратов, ИЦ Наука. – 2012. – С. 161-164.
70. Козлов, С.В. Сравнительная эффективность методов инструментальной диагностики диффузных поражений печени у собак /С.В. Козлов, С.Н. Жерлицын и др. //В сборнике: Инфекционные болезни животных и антимикробные средства. – 2016. – С. 120-124
71. Колхир, В.К. Диквертин – новое антиоксидантное и капилляропротекторное средство /В.К. Колхир и др. //Хим.-фарм. журнал. – 1995. – № 9. – С. 61-64.
72. Кондакова Н.В. Противолучевые свойства лекарственного средства "Диквертин" по микроядерному тесту *in vivo* при умеренных и малых дозах ионизирующей радиации /Н.В. Кондакова и др. //Вопр. биол., мед. и фармац. химии. – 2002. – № 3. – С. 46-49.

73. Кондрахин, И.П. Болезни печени и желчных путей. Внутренние незаразные болезни сельскохозяйственных животных /И.П. Кондрахин //М.: Агропромиздат. – 1991. – С. 252-274.
74. Кондрахин, И.П. Гепатоз молодняка крупного рогатого скота /И.П. Кондрахин // Ветеринария. – 1990. – Т. 65. – С. 41-45.
75. Корнен, Н.Н. Исследование гипохолестеринемических свойств рапсовых и подсолнечных лецитинов /Н.Н. Корнен, С.А. Калманович, Т.А. Шахрай, Е.В.Кузьминова М. П. Семенов /Новые технологии.– 2017. – № 3 – С.38-43.
76. Корнен, Н.Н. Исследование технологических свойств растительных лецитинов /Н.Н. Корнен, Т.А.Шахрай, М.В. Лукьяненко, А.А. Схалыхов /Новые технологии. – 2015. – № 3. – С. 19-24.
77. Корнен, Н.Н. Сравнительная оценка эффективности антиоксидантного действия рапсовых и подсолнечных лецитинов в опытах на лабораторных животных /Н.Н. Корнен, С.А. Калманович, М. П. Семенов, Е.В.Кузьминова /Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. – 2017. – № 5. – С. 9-14.
78. Королёва Л.Р. Современные гепатопротекторы /Л.Р. Королева //Российский медицинский журнал. – 2005. – № 2. – С. 35–37.
79. Корсун, В.Ф. Лекарственные растения в гепатологии /В.Ф. Корсун, С.М. Николаев, Т.Д. Даргаева и др. /Под ред. В.Ф. Корсуна. – М.: Русский врач, 2005. – 274с.
80. 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.
81. Круглова, О.Г. Влияние дигидрокверцетина на продукты перекисного окисления липидов при холодовом воздействии /О.Г. Круглова, В.А. Доровских, В.И. Тиханов и др. //Дальневост. мед. журн.–2011.–№3.–Ст.27.– С. 90-92.

82. Кузнецов, Н.И. Новые препараты для профилактики токсической гепатодистрофии и лечения животных /Н.И. Кузнецов //Ветеринария. – 1990. – № 3. – С. 9-11.
83. 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. – Воронеж: Истоки. – 1998. – С. 62-64.
84. Кузьминова, Е.В. Гепатопротекторная эффективность препарата на основе лецитина при токсическом поражении печени животных в условиях эксперимента //Е.В. Кузьминова, М.П. Семенов, Е.В. Тяпкина, В.А. Соболев //Ветеринария сегодня. – 2018. – № 1 (24). – С. 60-63.
85. Кузьминова, Е.В. Гепатопротекторы на основе фосфолипидов и их применение в ветеринарии /Е.В. Кузьминова, М.П. Семенов, В.А. Соболев //В сборнике «Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве» по материалам Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. – Екатеринбург. – 2017. – С. 243-247.
86. Кузьминова, Е.В. Диагностическое значение биохимических показателей крови при гепатопатологиях /Е.В. Кузьминова, М.П. Семенов, Е.А. Старикова, Т.В. Михалева //Ветеринария Кубани. –2013. –№ 5. – С. 11-13.
87. Кузьминова, Е.В. Изучение гепатопротекторной эффективности препарата, содержащего вещества фосфолипидной и полисахаридной природы на модели токсического поражения печени у животных /Е.В. Кузьминова, М.П. Семенов, Е.П. Викторова, Е.П. Долгов, В.А. Соболев, М.В. Лукьяненко //Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2019. – № 1. – С. 29-37.
88. Кузьминова, Е.В. Изучение эффективности эсвелана на модели лекарственного поражения печени /Е.В. Кузьминова, М.П. Семенов, С.И. Кононенко, В.А.Соболев //Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. – 2019. – № 293. – С. 161-165.

89. Кузьминова, Е.В. Перспективы расширения спектра применения гепатопротекторов в ветеринарии /Е.В. Кузьминова, М.П. Семенов, Е.А. Старикова, Е.В. Тяпкина, А.В. Ферсунин //Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2014. – № 102. – С. 787–797.
90. Кузьминова, Е.В. Применение гормональной терапии как причина развития патологии печени у животных /Е.В. Кузьминова, М.П. Семенов, В.А. Соболев, А.А. Абрамов //Успехи современной науки. – 2017. – Т. 6. № 2. – С. 130-134.
91. Кузьминова, Е.В. Современные подходы к лечению гепатопатий крупного рогатого скота /Е.В. Кузьминова, М.П. Семенов, Т.А. Шах-меликьян //Вестник ветеринарии. –2011. –№ 4 (59). –С. 135-137.
92. Кунц, Э. «Эссенциальные» фосфолипиды в гепатологии (экспериментальный и клинический опыт) /Э. Кунц, К. Гундерманн, Э. Шнайдер //Терапевтический архив. – 1994. – № 2. – С. 660-672.
93. Куркин, В.А, Флаволигнаны плодов *Silybum marianum* /В.А. Куркин, А.А. Лебедев, Г.Г. Запесочная и др. //Химия природных соединений. – 2001. – № 5. – С. 37-41.
94. Куркин, В.А. Расторопша пятнистая – источник лекарственных средств (обзор) //Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37 – № 4. –С. 27-41.
95. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов). – 3-е изд. /В.А. Куркин. – Самара, 2016. – 1279 с.
96. Лазебник, Л.Б. Неалкогольная жировая болезнь печени при дислипидемии и инсулинорезистентности: сходство и различия; дифференцированный подход к терапии /Л.Б. Лазебник, Л.А. Звенигородская, Е.Г. Егорова и др. //Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология – 2009. – № 8. – С. 4-11.
97. Лакин, К.М. Биотрансформация лекарственных веществ /К.М. Лакин, Ю.Ф. Крылов /М., 1981. – 342 с.

98. Лебедев, С.В. Морфофункциональное состояние печени животных при разной обеспеченности рациона микроэлементами /С.В. Лебедев, Е.А. Сизова //Сельскохозяйственная биология. – 2008. – №2. – С. 115-119.
99. Луценко, С.В. Растительные флаволигнаны. Биологическая активность и терапевтический потенциал /С.В. Луценко, Н.Б. Фельдман, Е.В. Луценко., В.А. Быков //Москва, 2006. – 235 с.
100. Ляхович, В.В. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков /В.В. Ляхович, И.Б. Цырлов //Новосибирск, 1981. – 240 с.
101. Маев, И.В. Роль эссенциальных фосфолипидов в современных схемах лечения неалкогольного стеатогепатита /И.В. Маев, Д.Т. Дичева, Е.Г. Лебедева и др. //Consilium-medicum (прил. гастроэнтерология). – 2011. – №1. – С. 34-37.
102. Макаренко, Т.Н. Разработка модели острого тетрациклинового гепатоза у крыс и получение его динамических предикторов /Т.Н. Макаренко, А.М. Дудченко, Л.Д. Лукьянова //Бюлл. экспериментальной биологии и медицины. – 1994. – № 12. – С. 603-606.
103. Малявина, В.В. Лекарственные препараты на основе фосфолипидов и их применение в медицинской практике (обзор) /В.В. Малявина, С.А. Томилина, А.М. Сампиев //Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Вып. 62. – Пятигорск, 2007. – С.554 – 559.
104. Мансуров, Х.Х. Метаболизм коллагена в печени при хронических, диффузных ее поражениях /Х.Х. Мансуров, Г.К. Мироджов //Успехи гепатологии. – Рига, 1981. – Вып. 9. – С. 25-38.
105. Маракулина, К.М. Взаимодействие природных фосфолипидов с антиоксидантами нового класса – изоборнилфенолами: Дис ... канд. хим. наук: 02.00.04. – Москва, 2016. – 132 с.
106. Махов, В.М. Жировая дистрофия печени и стеатогепатит – возможность смешанного варианта /В.М. Махов, А.А. Соколова //Русский медицинский журнал – 2011. – Т. 19, № 5. – С. 282-287.

107. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: пособие для врачей. 14-е изд. //М.: Изд-во Новая Волна, 2002. – Т.1. – С. 506-510.
108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. Методические рекомендации по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств. /Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Изд. «ФГБУ НЦЭСМП». – 2012. – С. 80-93.
113. Методические рекомендации по токсико-экологической оценке лекарственных средств, применяемых в ветеринарии //Воронеж. – 1998. –24 с.
114. Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма у животных /В.С. Бузлама, М.И. Рецкий, Н.П. Мещеряков, Т.Е. Рогачева //ГНУ ВНИВИПФиТ. – 1997. – 36 с.

115. Минушкин, О.Н. Циррозы печени: эпидемиологические и прогностические аспекты /О.Н. Минушкин, Л.В. Масловский, А.А. Фролова //Фарматека. – 2013. – № 14. – С. 98-103.
116. Мищенко, В.А. Проблема патологии печени у высокопродуктивных коров /В.А. Мищенко, А.В. Мищенко //Ярославский агровестник. – 2015. – № 1. – С. 16-17.
117. Моисеев, В.С. Лекарственная гепатотоксичность /В.С. Моисеев //Клинич. фармакология и терапия. – 2005. – Т. 14, № 1. – С. 10 – 14.
118. Мухин, Н.А. Пропедевтика внутренних болезней: учебник -4-е изд. //Н. А. Мухин, В.С. Моисеев //М., – 2009. – 848 с.
119. Наумов, А.А. Воздействие наноконлекса, содержащего антиоксидант, липид и аминокислоту, на раневую поверхность, вызванную термическим ожогом /А.А. Наумов, Ю.В. Шаталин, М.М. Поцелуева //Бюл. эксперимент. биологии медицины. – 2010. – №149 (1). С. 69–73.
120. Никитин, И.Г. Гепатопротекторы: мифы и реальные возможности /И.Г. Никитин //Фарматека. – 2007. – №13 (147). – С. 14–18.
121. Николаев, С.М. Растительные и лекарственные препараты при повреждениях гепатобилиарной системы /С.М. Николаев //Новосибирск: Наука. – 1992. – С. 155.
122. 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. – Новосибирск, 2005. – С. 324-325.
1. Никулин, И.А. Эффективность применения биологически активных веществ при гепатозе телят /И.А. Никулин, Ю.А. Шумилин //В сборнике: докладов Международной научно-практической конференции «Проблемы и перспективы научно-инновационного обеспечения агропромышленного комплекса регионов». – 2019. – С. 550-554.

123. Никулин, И.А. Опыт применения энергена для нормализации обмена веществ и функции печени у животных /И.А. Никулин, А.М. Самотин, О.А. Ратных, О.С. Корчагина //В сборнике: Современные технологии сельскохозяйственного производства сборник научных статей по материалам XXI Международной научно-практической конференции. – 2018. – С. 80-82.
124. Нифантьев, Э.Е. Химическая модификация и биологическая активность флавоноида дигидрокверцетина /Э.Е. Нифантьев, М.П. Коротеев, Т.С. Кухарева и др. //Butlerov Communications. – 2014. – Vol. 39. – No. 10. – P.194-120.
125. Новожеева, Т.П. Средства активации систем детоксикации среди циклических и линейных производных мочевины: Дис...докт. биол. наук. Томск, 1997. 358 с.
126. Оковитый, С.В. Гепатопротекторы: руководство /С.В. Оковитый и др. //М.: ГОЭТАР – Медиа, 2010. – 112 с.
127. Оковитый, С.В. Гепатотропные средства: современное состояние проблемы /С.В. Оковитый, Д.С. Суханов, М.Г. Романцов //Терапевт. арх. – 2012. – № 2. –С. 62–68.
128. Оробец, В.А. Болезни пищеварительной системы молодняка сельскохозяйственных животных /В.А. Оробец, В.А. Беляев, И.И. и др. //Ставрополь, 2012. – 286 с.
129. ОФС.1.1.0009.15 «Определение сроков годности лекарственных средств». <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0009-15-sroki-godnosti-lekarstvennyh-sredstv/>
130. Павлов, Ч.С. Современные представления о патогенезе, диагностике и лечении фиброза печени /Ч.С. Павлов, Ю.О. Шульпекова, В.Б. Золотаревский и др. //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2005. – Т. 15, № 2. – С. 13-20
131. Парк Д.В. Биохимия чужеродных соединений //М., 1973. – 288 с.
132. Патент № 2349317 «Средство, обладающее противоопухолевым действием, и способ его получения».

133. Питкевич, Э.С. Расторопша пятнистая – *Silybum marianum* (L.) /Э.С. Питкевич, А.Н. Лызиков, С.В. Цаприлова //Проблемы здоровья и экологии. – 2008. – № 4. – С. 119-126.
134. Плотников, М.Б. Лекарственные препараты на основе диквертина //М.Б. Плотников, Н.А. Тюкавина, Т.М. Плотникова //Томск: Изд-во ТГУ. – 2005. – С. 36–37.
135. Подымова, С.Д. Болезни печени /С.Д. Подымова //М.: Медицина, 1993. – 544 с.
136. Полунина, Т.Е. Лекарственные поражения печени /Т.Е. Полунина //Лечащий врач. – 2005. – № 3. – С. 69–72.
137. Поспелов, В.С. Расторопша пятнистая: вопросы биологии, культивирования и применения /В.С. Поспелов, В.Н. Самородов //Полтава: Изд-во Полтавской СХА, 2008. – 164с.
138. Потапович, А.И. Сравнительное исследование антиоксидантных свойств и цитопротекторной активности флавоноидов /А.И. Потапович, В.А. Костюк //Биохимия. – 2003. – Т. 68. – № 5. – С. 632-638.
139. Ращектаев, А.С. Фармако-клиническое обоснование применения препарата "Геприм для кошек" при жировом гепатозе: диссертация кандидата ветеринарных наук: 06.02.03 //Уральская государственная академия ветеринарной медицины. – Троицк. – 2015. – 129 с.
140. Роговский, В.С. Антипролиферативная и антиоксидантная активность новых производных дигидрокверцетина /В.С. Роговский, А.И. Матюшин и др. // Эксперим. и клин. фармакология. – 2010. – № 9. – С. 39-42.
141. Росихин, Д.В. Фармакогностическое исследование по обоснованию комплексного использования расторопши пятнистой /Д.В. Росихин, В.А. Куркин, В.М. Рыжов //Аспирантский вестник Поволжья. – 2015. – № 5-6 (2). – С. 342-346.
142. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств /под ред. А.Н. Миронова //М.: Гриф и К, – 2012. – 944 с.

143. 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.
144. Саратиков, А.С. Методические указания по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ. /А.С. Саратиков, И.В. Маркова, А.И. Венгеровский //Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. 2-е изд. Под общ. ред. проф. Р.У. Хабриева. М.: ОАО «Изд. «Медицина», – 2005. – 832 с.
145. Семененко М.П. Перспективы применения ливазена в терапии гепатоза коров, индуцированного метаболическими нарушениями /М.П. Семененко, Е.В. Кузьминова, А.А. Лысенко, Т.А. Зотова, Е.В. Тяпкина //Ветеринария Кубани. –2017. – № 1. – С. 12-14.
146. Семененко М.П. Этиопатогенез и особенности гепатотропной терапии коров при гепатозах /М.П. Семененко, Е.В. Кузьминова, Ф.Д. Онищук, Е.В. Тяпкина //Ветеринария. – 2016. – № 4. – С. 42-46.
147. Семененко, М.П. Гепатозащитная активность ликверола /М.П. Семененко, О.А. Фомин, С.И. Кононенко, Е.В. Кузьминова //Вестник Новосибирского государственного аграрного университета. – № 4 (45). – С. 116-123.
148. Семененко, М.П. Клиническая фармакология нового комплексного гепатопротекторного препарата /М.П. Семененко, М.Н. Соколов, Е.В. Кузьминова //Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. –2016. – № 119. – С. 1077-1088.
149. Семененко, М.П. Новые подходы к лабораторной диагностике болезней печени у высокопродуктивного молочного скота /М.П. Семененко, Е.В. Кузьминова, О.А. Фомин //Ветеринария Кубани. – № 3. – 2014. – С. 11–13.
150. Семененко, М.П. Повышение эффективности диагностики лекарственных поражений печени у животных с использованием математических моделей. /М.П. Семененко, В.А. Соболев, Н.Д. Кузьминов //В сборнике «Наука, образование и инновации для АПК: состояние, проблемы и перспективы» по

материалам V Международной научно-практической конференции, посвященной 25-летию образования Майкопского гос. технолог. ун-та. – Майкоп. – 2018. – С 193-196.

151. Семененко, М.П. Экспертные системы в повышении эффективности диагностики заболеваний печени у животных /М.П. Семененко, Е.В. Кузьмина, С.И. Кононенко, В.А. Соболев, Н.Д. Кузьминов //Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2018. – № 11. – С. 62-68.

152. Смирнов А.М. Научно-методологические аспекты исследования токсических свойств фармакологических лекарственных средств для животных /А.М. Смирнов, В.И. Дорожкин //Москва. – 2008. – 120 с.

153. Соболев, В.А. Гепатопротекторная терапия при лекарственно-индуцированном поражении печени у животных /В.А. Соболев, Е.В. Кузьмина, М.П. Семененко, В.В. Меньшенин //В сборнике научных трудов ФГБНУ КНЦЗВ по материалам научно-практической конференции «Научные основы повышения продуктивности и здоровья сельскохозяйственных животных». – Краснодар. – 2018. – Выпуск 7. Т 1. – С. 228-233.

154. Соболев, В.А. Доклиническое токсикологическое исследование гепатопротектора эсвелан /В.А. Соболев, Е.В. Кузьмина, М.П. Семененко, А.А. Абрамов //В сборнике «Актуальные проблемы и методические подходы к диагностике, лечению и профилактике болезней животных». – п. Персиановский. – 2019. – С. 91-95.

155. Соболев, В.А. К вопросу определения фракций средних молекул при патологических состояниях у собак /В.А. Соболев //В сборнике «Научное обеспечение агропромышленного комплекса» по материалам XI Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 95-летию Кубанского ГАУ и 80-летию образования Краснодарского края. – Краснодар. – 2017. – С. 156-158.

156. Соболев, В.А. Клиническая фармакология фосфолипидного препарата /В.А. Соболев, Е.А. Старикова, И.С. Жолобова //Журнал «Молодой Ученый». – 2017. – № 4 (138). – С. 271-275.
157. Соболев, В.А. Распространение гепатопатий у собак в условиях города Анапа /В.А. Соболев, Е.В. Кузьминова, М.П. Семененко, А.Н. Трошин //В сборнике «Актуальные проблемы современной ветеринарной науки и практики» по материалам Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института. – Краснодар. – 2016. – С. 104-107.
158. Соболев, В.А. Распространение и структура заболеваний печени у собак в условиях города Анапа /В.А. Соболев, Е.В. Кузьминова, М.П. Семененко //В сборнике «Пенитенциарная система и общество: опыт взаимодействия» по материалам Международной научно-практической конференции. – Пермь, ФКОУ ВО Пермский институт ФСИН России. – 2018. – С. 392-395.
159. Сокольская, Т.А. Создание лекарственных средств на основе плодов расторопши пятнистой (получение, стандартизация и контроль качества) /Т.А. Сокольская //Фармация. – № 1. – 2002. – С. – 32.
160. Сокольский, И. Что есть в мире библейских растений //Наука и жизнь, № 5. – 2006. (<http://www.nkj.ru/archive/articles/5723/>).
161. Староверов С.А., Гепатопротекторные свойства наноконлекса коллоидного селена конъюгированного с силимарином /С.А. Староверов, А.А. Волков, С.В. Козлов и др. /В сборнике: Актуальные проблемы ветеринарной хирургии, онкологии и терапии. – 2016. – С. 173-178.
162. Сторожаков, Г.И. Глицирризин в лечении хронических вирусных гепатитов /Г.И. Сторожаков, И.Е. Байкова //Клин фармакология и терапия. – 2000. – № 9. – С. 39-41.
163. Твердохлиб В.П. Молекулярные механизмы ранних химических повреждений печени и их адаптационная коррекция /В.П. Твердохлиб //Интеллект. Инновации. Инвестиции. – 2010. – № 4. – С. 179-182.

164. Терновой, К.С. Неотложные состояния: Патофизиология, клиника, лечение. Атлас /Ю. П. Бутылин, Ю. И. Бобылев //Киев: Здоров'я.– 1984. – 262 с.
165. Толстиков, Г.А. Глицирризиновая кислота /Г.А. Толстиков, Л.А. Балтина и др. //Биоорганическая химия. – 1997. – № 23. – С. 691-709.
166. Томилина, С.А. Лекарственные препараты на основе фосфолипидов и их применение в медицинской практике (обзор) /С.А. Томилина, В.В. Малявина, А.М. Сампиев //Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Вып. 62. – Пятигорск, 2007. – С.554-559.
167. Томилина, С.А. Оценка возможности количественного определения фосфатидилхолина в фосфолипидсодержащих препаратах методом инфракрасной спектроскопии аналитического метода определения фосфолипидов – метода инфракрасной спектроскопии (ИК-спектроскопии) /С.А. Томилина, В.В. Малявина, А.М. Сампиев //Кубанский научный медицинский вестник. – 2006. – № 1-2. – С. 113-115.
168. Уразаев, Д.Н. Вторичные ресурсы для изготовления лекарственных средств /Д.Н. Уразаев, В.И. Дорожкин //В сборнике: Актуальные проблемы ветеринарной медицины, посвященному 90-летию Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина. – Москва. – 2009. – С. 147-150.
169. Уша, Б.В. Ветеринарная гепатология //М.: КолосС, 1979. – 263 с.
170. Уша, Б.В., Беляков И.М. Ветеринарная пропедевтика //М.: КолосС, 2008. – 527 с.
171. Фельдман, Г.Л. Биоритмология //Ростов-на-Дону: Изд-во Рост, ин-та, 1982. – 80 с.
172. Цаприлова, С.В. Расторопша пятнистая: химический состав, стандартизация, применение /С.В. Цаприлова, Р.А. Родионова //Вестник фармации. – 2008. – № 3, Вып. 41.– С. 92-104.

173. Целуйко, С.С. Дигидрокверцетин и его эффективность при длительной экспериментальной гипергликемии /С.С. Целуйко, Н.П. Красавина, Л.С. Корнеева //Здоровье. Медицинская экология. Наука 1 (44) – 2011 – С. 92-95.
174. Шавырин, Д.И. Функционально-морфологические изменения в печени плотоядных при нарушении обмена веществ: автореф. кан.вет.н. 16.00.02. Москва, 2009. 30 с.
175. Шаманаев, А.Ю. Антиоксидантная активность композиции дигидрокверцетина с арабиногалактаном /А.Ю. Шаманаев, И.С. Иванов //«Молодежь и наука на Севере»: II Всероссийская молодежная научная конференция. – Сыктывкар. – 2013. – С. 214.
176. Шумянцева, В.В. Физико-химические методы как фактор воздействия на ферментативную активность белков /В.В. Шумянцева, Т.Л. Москвитина и др. //Вопр. мед. хим. – 1998. – Вып. 5. – С. 423–436.
177. Щукина, О.Г. Флавоноиды – антиоксидантная защита организма /О.Г. Щукина, Г.Г. Юшков и др. //Вестник АГТА. – № 1. – 2008. – С 76-78.
178. Яковенко, Э.П. Фиброз печени: механизмы развития и вопросы терапии /Э.П. Яковенко, А.Н. Иванов и др. //Фарматека. – 2011. – № 12. – С. 16-22.
179. Ahmed, H.A. Intrahepatic biliary cholesterol and phospholipid transport in humans: effect of obesity and cholesterol cholelithiasis /H.A. Ahmed, R.P. Jazrawi et al. //J Lipid Res. – 1995. – Vol. 36. – P. 2562-2573.
180. Alberts, B. Prostaglandins: then and now and next /B. Alberts, D. Bray et al. //Semin Arthritis Rheum. – 2003 – Vol. 33. – P. 137-139.
181. Audesirik, T. Biology, life on earth prentice hall /T. Audesirik, G. Audesirik //New Jersey. – 1999. – P. 256-279.
182. Avogaro, H. Phospholipids and atherosclerosis /H. Avogaro, A. Catapano //Raven Press, N.Y. – 1983. – P. 52-61.
183. Berkson, B.M. A conservative triple antioxidant approach to the treatment of hepatitis C. Combination of alpha lipoic acid (thioctic acid), silymarin, and seleni-

um: three case histories /B.M. Berkson //Med Klin (Munich). – 1999. – Vol. 94. – № 3. – P. 84-89.

184. Bevers, E.M. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation /E.M. Bevers, P. Comfurius, R.F. Zwaal //Biochim Biophys Acta. – 1983. – Vol. – P. 736, 57-66.

185. Blackburn, G.L. Amino Acid Metabolism and medical applications /G.L. Blackburn, J.P. Grant, V.R. Yoring // London: J. Wright Inc. – 1983. – 520 p.

186. Calderon, R.O. Lipid composition and phospholipid asymmetry of membrane from Schwann cell line /R.O. Calderon, G.H. DeVries //J Neurosci Res. – 1997. – Vol. 49. – P. 372-380.

187. Carducci, R. Silybinin and acute poisoning with *Amanita phalloides*, Armellino NIF /R. Carducci, C. Volpe //Minerva Anesthesiol. – 1996. – Vol. 62. – P. 187-193.

188. Center, S.A. Balanced therapy for chronic liver disease /S.A. Center //WALTHAM Focus, 2010. – Vol. 10. – P. 20-31.

189. Center, S.A. Nutritional support for dogs and cats with hepatobiliary disease /S.A. Center //Journal of Nutrition. – 1998. – Vol. 128. – P. 2733-2746.

190. Chang, G.W. The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes /G.W. Chang, P.C. Kam //Anaesthesia. – 1999. – Vol. 54, № 1. – P. 42–50.

191. Chanussot, F. Prevention by the dietary (n-6) polyunsaturated phosphatidylcholines of intrahepatic cholestasis induced by ciclosporine A in animals /F.Chanussot, L.Benkoel //Life Sci. – 2003. – Vol. 73. – P. 381-392.

192. Chaudhury, S. Amplification of CCl<sub>4</sub> toxicity by chlordecone: destruction of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 subpopulation /S. Chaudhury, H.M. Mehendale //J Toxicol Environ Health. – 1991. – Vol. 32. – P. 277-294.

193. Cholbi, M.R. Inhibitory effects of phenolic compounds on CCl<sub>4</sub> – induced microsomal lipid peroxidation /M.R. Cholbi, M. Paya, H.Y. Alcaras //Experientia. – 1991. – Vol.47. – P. 195-199

194. Chrungoo, V.J. Silymarin mediated differential modulation of toxicity induced by carbon tetrachloride, paracetamol and D-galactosamine in freshly isolated rat hepatocytes /V.J. Chrungoo, K. Singh , I .Singh //Indian J Exp Biol. – 1997. – Vol. 35. – P. 611-617.
195. Claria J., Arroyo V. Prostaglandins and other cyclooxygenase-dependent arachidonic acid metabolites and the kidney in liver disease. Prostaglandins Other Lipid Mediat. – 2003. – Vol. 72. – P. 19-33.
196. Clark, J.D. Cytosolic phospholipase A2 /J.D. Clark, A.R. Schievella et al. //J Lipid Mediat Cell Signal. – 1995. – Vol. 12. – P. 83-117.
197. Coon, J. Complementary and alternative therapies in the treatment of chronic viral hepatitis: a systematic review /J. Coon //J. Hepatol. – 2004. – Vol. 40. – P. 491-500.
198. Corchete, P. *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the source of silymarin /P. Corchete, K.G. Ramawat, J.M. Merillon //Bioactive molecules and medicinal plants. – Berlin Heidelberg: Springer. – 2008. – P. 123-148.
199. Deak, G. Immunomodulator effect of silymarin therapy in chronic alcoholic liver diseases /G. Deak, G. Muzes et al. //Orv. Hetil. – 1990. – Vol. 131(24). – P. 1291–1292.
200. Desplaces, A. The effects of silymarin on experimental phalloidine poisoning /A. Desplaces, J. Choppin, G. Vogel, W. Trost //Arzneimittelforschung. – 1975. – Vol. 25(1). – P. 89–96.
201. Devaux, P.F. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes //Biochemistry. – 1991. – Vol. 30. – P. 1163-1173.
202. Ekins, S. The role of CYP2B6 in human xenobiotic metabolism /S. Ekins, S.A. Wrighton //Drug Metab. Rev. – 1999. – Vol.31, № 3. – P. 719-754.
203. Farghali, H. Silymarin effects on intracellular calcium and cytotoxicity: a study in perfused rat hepatocytes after oxidative stress injury /H. Farghali, H L. Kamenikova, S .Hynie //Pharmacol Res. – 2000. – Vol. 41, No. 2 – P. 231-238.

204. Gappelletti, E.M. Silymarin localization in the fruit and seed *Silybium marianum* (L.) Gaertn. /E.M. Gappelletti, R. Caniato //Herba hung. – 1984. – Vol. 23. No.1-2. – P. 53-66.
205. Gardiner, T. Biological activity of eight known dietary monosaccharids required for glycoprotein synthesis and cellular recognition processes: summary /T. Gardiner //GlycoScience & Nutrition. – 2000. – Vol. 1. – P. 1- 4
206. Goonesinghe, A. Pro-apoptotic Bid induces membrane perturbation by inserting selected lysolipids into the bilayer /A. Goonesinghe, E.S. et al. //Mundy Biochem J. – 2005. – Vol. 387. – P. 109-118.
207. Greenlee, H. Clinical applications of Silybum marianum in oncology /H. Greenlee, K. Abascal et al. //Integr. Cancer Ther. – 2007. – Vol. 6(2). – P. 158-165.
208. Gundermann, K.-J. Fd. The "essential" phospholipids as a membrane therapeutic Publisher Polish Section of European Society of biochemical pharmacology // Szczecin. – 1993. – P. 2-17.
209. Honkakoski, P. Expression, inducibility, and catalytical properties of cytochrome P450 family 2 isozymes isolated from mouse liver /P. Honkakoski //Kuopio. – 1992. – 74 p.
210. Imai, T. Flavonoids as inhibitors or enhancers of the cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha in L-929 tumor cells /T. Imai, Y. Kageyama, J. Tobaru //J. Nat. Prod. – 1997. – Vol. 60. – № 8. – P. 775-778.
211. Ito, M. Interaction of smooth muscle myosin phosphatase with phospholipids /M. Ito, J. Feng et al. //Biochemistry. – 1997. – Vol. 36. – P. 7607-7614.
212. Kinjo, J. Hepatoprotective constituents in plants. Effects of soyasapogenol B, sophoradiol, and their glucuronides on the cytotoxicity of tert-butyl hydroperoxide to HepG2 cells /J. Kinjo, T. Hirakawa et al. //Biol Pharm Bull. – 2003. – Vol. 26. – P. 1357-1260.
213. Kolstad, O., Combination of recombinant human growth hormone and glutamine-enriched total parenteral nutrition to surgical patients: effects on circulating

- amino acids /O. Kolstad, T.G. Jenssen, et al. //Clin. Nutr. – 2001. – Vol.. 20, N.6. – P.503-510.
214. Kren, V. Silybin and silymarin – new effects and applications /V. Kren, D. Walterova //Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. – 2005. – Vol. 149(1): 29(<http://publib.upol.cz/~obd/fulltext/Biomed/2005/1/29.pdf>).
215. Kumar Ashwani Relative induction of molecular forms of cytochrome P450 in hexachlorocyclohexane exposed rat liver microsomes //Kumar Ashwani //Arch. Toxicol. – 1988. – Vol. 62, №. 6. – P. 479-481.
216. Kurchenko, V. Induction of cytochrome P-450 molecular forms by aminobiphenyls /V.Kurchenko, I. Pronskaya, A. Piculev //7-th Int. Conf. “Biochem. and Biophys. cytochrome P-450; Struct. and Funct. Biotechnol. and Ecol. Aspects. – Moscow, July 28 – Aug. 2. 1991. – P. 67-73.
217. Kurth, E.F. Extraction of tannin and dihydroquercetin from Douglas-fir bark /E.F. Kurth, F.L. Chan //J. Amer. Leather Chem. Assoc. – 1953. – Vol. 48, № 1. – P. 20-32.
218. Kuzminova, E.V. Hepatoprotective Efficiency of the Preparation Based on Lecithin at Medicinal-Induced Liver Damage in Laboratory Animals /E.V. Kuzminova, M.P. Semenenko, V.A. Sobolev, V.V. Malyavina //Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2019. – RJPBCS 10(2). – Page No. 1612-1617.
219. Kuzminova, E.V. Current approaches to hormonal therapy in animals with immuno-mediated arthritis /E.V. Kuzminova, M.P. Semenenko, V.A. Sobolev et al. //Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (JPSR). – Vol. 9(12). – 2017. – Pages: 2346-2348.
220. Lang, I. Hepatoprotective and immunomodulatory effects of antioxidant therapy /I. Lang, G. Deak, et al. //Acta Med. Hung. – 1988. – Vol. 45. – P. 287–295.
221. Liang, Y. Mitochondria from TRAIL-resistant prostate cancer cells are capable of responding to apoptotic stimuli /Y. Liang, M.A. Eid, R.W. Lewis, M.V. Kumar //Cell Signal. – 2005. – Vol. 17. – P. 243-251.

222. Li, M. p38 MAP kinase mediates inflammatory cytokine induction in cardiomyocytes and extracellular matrix remodeling in heart /M. Li, D. Georgakopoulos et al. //Circulation. – 2005. – Vol.111 (19). – P. 2494-2502.
223. Luper, S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part Altern //Med. Rev., 1998. – Vol. 3(6). – P. 410-421. <http://www.thorne.com/altmedrev/.fulltext/3/6/410.pdf>.
224. Mari, M. Redox Control of Liver Function in Health and Disease /M. Mari, A. Colell, A. Morales et al. //Antioxidants &Redox signaling. – 2010. – Vol. 12. - № 11. – P. 1295-1331.
225. McEvoy, L. Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages /L. McEvoy, P. Williamson, R.A. Schlegel //Proc Natl Acad Sci USA. – 1986. – Vol. 83 – P. 3311-3315.
226. Muzes, G., Effect of silimarin (Legalon) therapy on the antioxidant defense mechanism and lipid peroxidation in alcoholic liver disease (double blind protocol) /G. Muzes, G. Deak et al. //Orv. Hetil. – 1990. – Vol. 131(16). – P. 863-866.
227. Nagase, H. Mutually regulated expression of caspase-activated DNase and its inhibitor for apoptotic DNA fragmentation /H. Nagase, H. Fukuyama, et al. //Cell Death Differ. – 2003. – Vol. 10. – P. 142-143.
228. Ozturk Y. Fatty liver in childhood /Y. Ozturk, O.B. Soylu //World J Hepatol. – 2014. – P. 33-40.
229. Par, A. Oxidative stress and antioxidant defense in alcoholic liver disease and chronic hepatitis C. /Par A., Roth E., Rumi G. Jr. et al. //Orv. Hetil. – 2000. – Vol. 141(30). – P.1655-1659.
230. Post-White, J. Advances in the use of milk thistle (Silybum marianum) /J.Post-White, E.J. Ladas, K.M. Kelly //Integr. Cancer Ther. – 2007. – Vol. 6(2). – P. 104-109.
231. Pradhan, S.C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine /S.C. Pradhan, C. Girish //Indian J. Med. Res. – 2006. – Vol. 124. – P. – 491-502(<http://www.icmr.nic.in/ijmr/2006/november/1103.pdf>).

232. Pulfer, M. Electrospray mass spectrometry of phospholipids /M. Pulfer, R.C. Murphy //Mass Spectrom Rev. – 2003. – Vol. 22. – P. 332-364.
233. Ramasamy, K. Multitargeted therapy of cancer by silymarin /K. Ramasamy, K. R. Agarwal //Cancer Lett. – 2008. – Vol. 269, No.2. – P. 352-362.
234. 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.
235. Santini, F. Evidence that the human placental monodeiodinase is phospholipid-requiring enzyme /F.Santini, I.J. Chopra et al. //J Clin Endocrinol Metab. – 1992. – Vol. 74. – P. 1366-1371.
236. Schlegel, R.A. Membrane phospholipid asymmetry as a factor in erythrocyte-endothelial cell interactions /R.A. Schlegel, T.W. Prendergrast, P. Williamson //J Cell Physiol. – 1985. – Vol. 123. – P. 215-218.
237. Scholz, H. Prostaglandins /H.Scholz //Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. – 2003. – Vol. 285. – P. 512-514.
238. Schrieber, S.J. The pharmacokinetics of silymarin is altered in patients with hepatitis C virus and nonalcoholic Fatty liver disease and correlates with plasma caspase-3/7 activity /S.J. Schrieber, Z. Wen, M. Vourvahis et al. //Drug Metab. Dispos. – 2008. – Vol. 36(9). – P. 1909-1916.
239. Shaun, D.B. Membrane topology of the mammalian P-450 cytochromes /D.B. Shaun //The FASEB Journal. – 1992. – Vol. 6. – P. 680 - 685.
240. Skottovak, N. Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug /N. Skottova, V. Krecman //Physiol. Res. – 1998. – Vol. 47(1). – P. 1-7.
241. Tamayo, C. Review of clinical trials evaluating safety and efficacy of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) /C. Tamayo, S. Diamond //Integr. Cancer Ther. – 2007. – Vol. 6(2). – P. 146-157.
242. Tanaka, Y. Effect of lipid peroxidation on membrane bound enzymes of endoplasmic reticulum /Y. Tanaka, A.J. Schroit //Biochem J. – 1971. – Vol. 123, – P. 983-987.

243. Tanaka, Y. Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells. Recognition by autologous macrophages /Y. Tanaka, A.J. Schroit //J Biol Chem. – 1983. – Vol. 258. – P. 11335-11343.
244. Veldhuizen, R. Phospholipid metabolism in lung surfactant /R.Veldhuizen, F. Possmayer //Subcell Biochem. – 2004. – Vol. 37. – P. 359-388.
245. Vogel, G. Protection by silibinin against Amanita phalloides intoxication in beagles /G. Vogel, B. Tuchweber, W. Trost, U. Mengs //Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1984. – Vol. 73(3). – P. 355-362.
246. Vogel, G.A peculiarity among the Flavonoids - silymarin, a compound active on the liver /G.A. Vogel //Flavonoids and Bioflavonoids: Akademiai Kiado. – Budapest. – 1982. – P. 461-474.
247. Wagner, H. Antihepatotoxic flavonoids /H. Wagner et al. //Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships. – New York: Alan R. Liss, Inc. – 1986. – P. 545-558.
248. Watkins, M.D. Role of cytochromes P-450 in drug metabolism and hepatotoxicity /M.D. Watkins //Seminars in liver disease. – 1990. – Vol. 10, 4. – P. 235-250.
249. Wellington, K. Silymarin: a review of its clinical properties in the management of hepatic disorders /K. Wellington, B. Jarvis BioDrugs. – 2001. – Vol. 15(7). – P. 465–489.
250. West, H.J. Effect on liver function of acetonemia and the fat cow syndrome in cattle /H.J. West //Res. in veter. Sc.– 1990.– T. 48. – № 2. – P. 221-227.
251. West, H.J. Liver function of dairy cows in late pregnancy and early lactation /H.J. West //Res. in veter. Sc. – 1989.– T. 46. № 2. – P. 231-237.
252. WHO monographs on selected medicinal plants. Fructus Silybi Mariae. – Volume 2. World Health Organization, Geneva, – 2002. – P. 300–316. (<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/29.html>; <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4927e/s4927e.pdf>).
253. Zeisel, S.H. Choline: needed for normal development of memory /S.H. Zeisel //J Am Coll Nutr. – 2000. – Vol. 19. – P. 528-531.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Рассмотрено и одобрено Ученым советом  
Краснодарского научно-исследовательского  
ветеринарного института – обособленного  
структурного подразделения ФГБНУ  
«Краснодарский научный центр по зоотех-  
нии и ветеринарии»

Протокол № 1 от 14 марта 2019 года  
Председатель совета, доктор с.-х. наук  
Н. Н. Забашта  
" 14 " марта 2019 г.



## **ИНСТРУКЦИЯ**

по применению препарата ЭСВЕЛАН в ветеринарии  
(в порядке производственных испытаний)

### **ИЗГОТОВЛЕНО:**

Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт – обособ-  
ленное структурное подразделение ФГБНУ «Краснодарский научный центр  
по зоотехнии и ветеринарии», 350004, Россия, г. Краснодар, ул. 1-я Линия, 1.

## **1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ**

1.1 ЭСВЕЛАН (ESVELAN) представляет собой биогель, содержащий в 1 мл:  
лецитин (в пересчете на фракцию PPh) – 100 мг; метионин – 30 мг; силима-  
рин (в пересчете на силибинин) – 20 мг; дигидрокверцетин – 2 мг; вспомога-  
тельные вещества.

1.2 По внешнему виду эсвелан представляет собой гель, однородный по кон-  
систенции, коричневого или желто-коричневого цвета.

1.3 Фармакологическая группа – гепатопротектор.

## **2. ФАСОВКА И МАРКИРОВКА**

2.1 Эсвелан расфасовывают в полимерные флаконы по 25 мл и 50 мл, герме-  
тично укупоренные с навинчивающимися крышками и контролем первого  
вскрытия. Каждый флакон упакован в картонную коробку в комплекте со  
шприцом-дозатором. Возможна фасовка в алюминиевой тубе по 50 мл геля.

2.2 Хранят препарат в закрытой упаковке в сухом, защищенном от прямых  
солнечных лучей месте, отдельно от пищевых продуктов и кормов, при  
температуре от 2°C до 25°C.

2.3 Срок годности препарата при соблюдении условий хранения – 1,5 года со  
дня производства. Не использовать препарат после истечения срока  
годности.

### 3. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

3.1 Эсвелан – лекарственный препарат гепатопротекторного действия. Его компоненты избирательно оказывают влияние на гепатоциты, что положительно влияет на ход лечения заболеваний печени у животных.

*Эссенциальные фосфолипиды* служат строительным материалом в клеточных мембранах. Их основные функции заключаются в поддержании нормальной текучести и репарации клеточных мембран, антиоксидантном действии, защите митохондриальных и микросомальных ферментов от повреждения.

*Силимарин* – антиоксидант и детоксикант, ускоряющий метаболизм и улучшающий регенерацию печени.

*Метионин* необходим для нормального обмена веществ, обладает гепатопротекторным действием.

*Дигидрокверцитин* защищает печень за счет улучшения функций клеточных оболочек и структуры гепатоцитов, связывает токсины в стабильную форму и способствует их выведению из организма за счет улучшения капиллярного кровотока.

3.2 Эсвелан относится к малоопасным веществам (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76), не обладает местно-раздражающими, эмбриотоксическими и тератогенными свойствами.

### 4. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

4.1 Эсвелан назначают животным самостоятельно или в составе комплексной терапии при заболеваниях печени различной этиологии (гепатиты, жировая дистрофия печени и др.), а также токсических поражениях печени, вызванных экзо- и эндотоксикозами (микотоксины, ксенобиотики, тяжелые металлы и др.). Применяют животным для снижения побочных эффектов при назначении гепатотоксичных химиотерапевтических средств.

4.2 Противопоказанием к применению препарата является повышенная индивидуальная чувствительность животного к компонентам препарата.

4.3 Дозы и способ применения:

Собакам эсвелан задают внутрь индивидуально во время кормления или непосредственно вливают в защечную область при помощи шприца-дозатора 1 или 2 раза в день с общей суточной дозой 0,2 мл на 1 кг массы тела. Курс применения составляет 30 дней, в зависимости от индивидуальных особенностей организма и характера течения заболевания. При необходимости по указанию ветеринарного врача прием препарата можно возобновить через 2-3 недели.

4.4 Симптомы передозировки у животных не выявлены. Особенности действия препарата при его первом применении и отмене не установлено. При применении препарата в соответствии с настоящей инструкцией побочных явлений и осложнений, как правило, не наблюдается. В случае появления аллергических реакций использование препарата прекращают и назначают животному антигистаминные и симптоматические средства.

## 5. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

2

5.1 При применении препарата эсвелан следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными средствами.

5.2 Пустые упаковки из-под лекарственного препарата запрещается использовать для бытовых целей, они подлежат утилизации с бытовыми отходами.

Инструкция разработана: *Краснодарский научно-исследовательский ветеринарный институт – обособленное структурное подразделение ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии», 350004, Россия, г. Краснодар, ул. 1-я Линия, 1.*

**УТВЕРЖДАЮ:**

Директор ветеринарной клиники  
"Доктор Томас" г-к Анапа

Д.В. Сокол

2019 г.



**АКТ**

**по изучению эффективности препарата ЭСВЕЛАН  
при лечении гепатоза у собак**

Нами, заведующей отделом фармакологии Семененко М.П., ведущим научным сотрудником Кузьминовой Е.В., аспирантом Соболевым В.А. (ФГБНУ «КНЦЗВ») и ветеринарным врачом клиники "Доктор Томас" Лазаренко В.В. составлен настоящий акт о том, что в условиях ветеринарной клиники "Доктор Томас", г-к Анапа, Краснодарского края (в 2018 году) проведены исследования по изучению эффективности препарата эсвелан при лечении хронического жирового гепатоза у собак.

Для проведения опыта были отобраны больные собаки различных пород, возраста и массы тела, которые были методом парных аналогов были сформированы в две группы, по 20 животных в каждой: первая группа (опытная) – содержалась на диетическом кормлении, при этом был назначен гепатопротектор эсвелан, внутрь 1 или 2 раза в день (с общей суточной дозой 0,2 мл на 1 кг массы тела); вторая группа (контрольная) содержалась также на диетическом кормлении, но применяли препарат гепатовет в дозе 0,1 мл/кг массы тела внутрь за 30 минут до кормления три раза. Опыт проводился в соответствии с методиками проведения научных и производственных исследований. За собаками в течение всего срока эксперимента вели клиническое наблюдение, обращая внимание на динамику массы тела и биохимические показатели крови.

В результате проведенных исследований установлено, что общий курс лечения собак с препаратом эсвелан составил  $33,5 \pm 2,5$  суток, а у контрольных аналогов  $42,0 \pm 5,4$  дня. Улучшение общего состояния, восстановление аппетита и температура тела в опытной группе начиналось в среднем после 10 дней лечения, а в контроле после двухнедельной терапии.

Клинически эффективность лечения проявлялась в прекращении рвоты и диареи, снижался зуд вплоть до полного прекращения. На пораженных участках кожа подсыхала и покрывалась корочкой, с последующим очищением. К месячному периоду у собак опытной группы в местах алопеций наблюдали активный рост волос. При пальпации болезненность в области печени отсутствовала.

У собак обеих групп при лечении происходила нормализация гематологических показателей: снижение концентрации лейкоцитов, разница которых в опытной группе на 21 сутки эксперимента относительно контрольных собак составила 18,2 % ( $P \leq 0,01$ ) и на 30 день – 13,1 % ( $P \leq 0,05$ ); уровень эритроцитов и гемоглобина повышался, при этом разница между опытом и контролем составила по эритроцитам на 21 сутки – 7,4 % и на 30 – 9,8 % ( $P \leq 0,05$ ), по гемоглобину на 21 сутки – 10,5 % ( $P \leq 0,05$ ) и на 30 – 13 % ( $P \leq 0,01$ ).

В целом, динамика биохимических показателей крови показала более эффективное восстановление структуры и функций печени при использовании в лечении эсвелана.

#### **Выводы:**

Включение в схему комплексной терапии хронического жирового гепатоза у собак разработанного препарата эсвелан способствует более эффективной терапии больных животных за счёт улучшения клинического статуса, оптимизации гематологических и биохимических показателей, нормализации протеинсинтетической, пигментообразовательной и детоксикационной функций печени. Применение гепатопротектора эсвелан обеспечивает более быстрое выздоровление животных (в среднем на  $8,5 \pm 1,5$  дней), относительно препарата сравнения.

Таким образом, считаем целесообразным и экономически оправданным применение препарата эсвелан для лечения гепатозов у собак.

Зав. отделом фармакологии,  
доктор вет. наук



Семенов М.П.

В.н.с. отд. фармакологии,  
доктор вет. наук



Кузьмина Е.В.

Аспирант



Соболев В.А.

Ветеринарный врач клиники



Лазаренко В.В.

**УТВЕРЖДАЮ:**

Директор ветеринарной клиники  
«Кот и Пес», г. Советская Гавань

М.В. Соболева



2018 г.

## **АКТ**

### **по изучению эффективности препарата эсвелан на собаках**

Нами, заведующей отделом фармакологии Семененко М.П., ведущим научным сотрудником Кузьминовой Е.В., аспирантом Соболевым В.А. (ФГБНУ «КНЦЗВ») и ветеринарным врачом клиники "Кот и Пес Гаража В.Е. , составлен настоящий акт о том, что в условиях ветеринарной клиники "Кот и Пес", г. Советская Гавань, Хабаровского (в период 2016-2018 гг.) проведены исследования по изучению эффективности препарата эсвелан на собаках.

В результате проведенных исследований установлено, что у собак (n=100), получавших длительное лечение преднизолоном, в ряде случаев развивалась патология печени. Так, у 48 % собак при ультразвуковом исследовании зарегистрированы патологические изменения в печени – воспалительного характера (16 %) и дистрофического (32 %). При биохимическом анализе в крови у собак, с признаками патологических процессов в печени наблюдались изменения, указывающие на гепатоцеллюлярную утечку и холестаза.

На втором этапе исследований собак с признаками лекарственно-индуцированной патологии печени разделили на 3 группы по 10 особей в каждой. В 1 опытной группе дополнительно к базовому лечению назначали эсвелан, во 2 – гепатовет, 3 группа собак была контрольной, где лечение проходило без применения гепатопротекторных препаратов.

Экспериментально выявлено, что длительное лечение собак преднизолоном и включением в схему терапии гепатопротекторов предупреждает развитие патологических изменений в печени. К концу опыта у собак 1 опытной группы при клиническом обследовании болезненность в области печени и увеличение ее размеров отсутствовали, при этом ультразвуковое исследование не выявило значимых патологических изменений в структуре органа. Во 2 опытной группе у 20 % собак были выявлены признаки гепатопатии, тогда как у контрольных животных патология диагностирована у 70 % животных.

Динамика биохимических показателей крови собак, представленная в таблице, свидетельствует об эффективности гепатотропной терапии – в опытных группах уровень АсАТ, АлАТ, ЩФ и билирубина соответствовал

параметрам нормы, что свидетельствует об отсутствии цитолитического синдрома и холестаза в печени.

Таблица – Биохимические показатели крови собак в конце опыта, при длительной терапии преднизолоном и применением гепатопротекторов ( $M \pm m$ ;  $n=10$ )

Показатели	1 опытная	2 опытная	3 контроль	Норма
АлАТ, Ед/л	52,7 $\pm$ 1,3*	57,4 $\pm$ 3,3	69,4 $\pm$ 1,8	15-58
АсАТ, Ед/л	35,5 $\pm$ 2,5*	41,8 $\pm$ 3,9	44,7 $\pm$ 2,6	16-43
ЩФ, Ед/л	92,9 $\pm$ 4,2	95,3 $\pm$ 5,7	103,6 $\pm$ 3,9	10-100
Общий билирубин, мкМ/л	5,3 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 0,7	7,5 $\pm$ 0,5	1,7-10

Примечание: \* – степень достоверности  $P \leq 0,05$  по отношению к контролю

В группе собак без применения гепатопротекторов активность аминотрансфераз находилась на более высоком уровне, в сравнении с животными опытных групп: в 1 группе на 31,7 % (АлАТ) и 25,9 % (АсАТ); во 2 группе на 16,8 % (АлАТ) и на 6,9 % (АсАТ). Средний показатель ЩФ у контрольных собак был выше нормы с разницей на 11,5 % по отношению к 1 группе животных и на 8,7 % по отношению ко 2 группе.

Таким образом, на основании проведенного исследования выявлено, что побочное действие преднизолона при его длительном применении может привести к развитию лекарственно-индуцированного поражения печени с доминантой гепатоцеллюлярной формы при сочетании холестатического эффекта. Следовательно, животным, длительно получающим преднизолон, требуется контроль за состоянием печени, при этом используя гормональную терапию рационально дополнительно применять препараты гепатопротекторного действия, которые повышают функциональную способность клеток печени к детоксикации и выведению различных ксенобиотических веществ, а также стимулируют регенерацию гепатоцитов.

Зав. отделом фармакологии,  
доктор вет. наук

Семенов М.П.

В.н.с. отд. фармакологии,  
доктор вет. наук

Кузьмина Е.В.

Аспирант

Соболев В.А.

Ветеринарный врач клиники

Гаража В.Е.