

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ  
КЫРГЫЗСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

На правах рукописи

УДК – 615.43 +615 + 004.12 +58

**ИСМАИЛОВ ИСАБЕК ЗАЙЛИДИНОВИЧ**

**Фармакогностические особенности и фармакологические  
свойства *Padus Grayanae Maxim***

15.00.01. – «технология лекарства и организация фармацевтического дела»

14.00.25. – «фармакология, клиническая фармакология»

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

22  
19-20/10

Бишкек 2004

Работа выполнена в лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии адаптивных процессов ЦНИЛ Кыргызской государственной медицинской академии

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук,  
профессор

А.З. Зурдинов

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук,  
профессор

Яворский А.Н.

доктор фармацевтических наук

Арстанбекова А.А.

**Ведущая организация:**

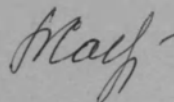
Таджикский государственный медицинский университет им. Абуали ибн Сино

Защита диссертации состоится «18» июня 2004 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета К 14.04.235 при Кыргызской государственной медицинской академии по адресу: 720020, г. Бишкек, ул. Ахунбаева, 92.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кыргызской государственной медицинской академии.

Автореферат разослан "17" мая 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.м.н., доцент

 Сабилова Т.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** В последние годы отмечается значительное повышение интереса к проблеме неспецифической иммуностимуляции, обусловленное увеличением случаев снижения иммунологической реактивности организма. Зачастую иммунодепрессия развивается под влиянием различных факторов, в том числе при использовании, как классических иммунодепрессантов, так и других лекарственных препаратов, которым в той или иной степени присущи подобные свойства, например, антибиотиков, нестероидных противовоспалительных средств и т.д.

В такой ситуации трудно переоценить значение лекарственных средств из группы иммуномодуляторов. Арсенал таких препаратов весьма ограничен, хотя в последние годы, благодаря достижениям в области иммунофармакологии, положение изменилось к лучшему [Пинегин Б.В., Истамов Х.М., 1995; Богатова Р. И., 1995; Кириллов В.И., 1998; Караулова А. В., 1999; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1999; Нестерова И.В., Сепиашвили Р.И., 2000; Сепиашвили Р.И., 2001].

Надо отметить, что к концу XX столетия во многих странах мира интерес клиницистов к препаратам растительного происхождения увеличился. ВОЗ также признала ценность растительных лекарств, используемых большей частью населения мира и их вклад в профилактику и лечение многих заболеваний. Растущий интерес к их употреблению создал необходимость большей точности в их изготовлении и оценке, а также стимулировал рост исследований растительных лекарств разного назначения и применения [ВОЗ, 1980; WHO, 1990; WHO; 1998: WHO/TRM/98.1 WHO; 1999].

Следовательно, поиск и изучение растительных иммуномодуляторов, их внедрение в клиническую практику имеет как научное, так и большое прикладное значение. Они перспективны в качестве лечебных и профилактических средств.

Известен ряд неспецифических стимуляторов иммунитета растительного происхождения – препараты элеутерококка, женьшеня, эхинацеи, левзеи, радиолы розовой и др. Иммуномодулирующие свойства наиболее изучены у элеутерококка, эхинацеи и женьшеня. Надо отметить, что ареалами распространения элеутерококка колючего и женьшеня являются Дальний Восток, Приморский край и Южный Сахалин, и поэтому вся эта группа препаратов поступает в Кыргызстан только по импорту.

В связи с вышеизложенным, разработка новых фитопрепаратов с иммуномодулирующей активностью, которые можно получить из местного лекарственного сырья, является как актуальной, так и необходимой, что и послужило основанием для проведения настоящего исследования.

**Цель работы.** Получение нового оригинального иммуномодулятора из листьев *Padus Grayanae Maxim.*

**Задачи исследования.**

1. Изучить морфолого-анатомическое строение листьев *Padus Grayanae Maxim.*
2. Провести фитохимический анализ листьев изучаемого растения.
3. Изучить сезонную динамику накопления биологически активных веществ в листьях указанного растения в зависимости от периодов вегетации.
4. Разработать оптимальную лекарственную форму из них и методы стандартизации.
5. Изучить спектр фармакологической активности и токсикологические характеристики полученного фитопрепарата.

**Научная новизна.** Впервые изучено морфолого-анатомическое строение лекарственного сырья, накопление в нем биологически активных веществ в зависимости от сроков вегетации, а также установлены оптимальные сроки его заготовки. На основании полученных данных разработана технология получения нового оригинального растительного иммуномодулятора из местного растительного сырья и нормативная документация на него. Впервые проведено доклиническое изучение фармакологических свойств и токсикологических характеристик нового галенового препарата из *Padus Grayanae Maxim.*

**Практическая значимость.** В результате проведенных исследований получены данные по фармакогнозии изучаемого растения, стандартизации лекарственного растительного сырья, технологии получения и стандартизации галенового препарата, разработана нормативно-техническая документация (ВФС) на него. Лекарственное сырьё и фитопрепарат из *Padus Grayanae Maxim* официально зарегистрированы в Департаменте лекарственного обеспечения и медицинской техники МЗ Кыргызской Республики (регистрационное удостоверение Р – 2003 N 1840).

**Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Отличительными диагностическими признаками для листьев *Padus Grayanae Maxim* являются: клетки эпидермиса листьев довольно крупные и тонкостенные. У верхнего эпидермиса они имеют более извилистые очертания; устьица расположены только на нижней стороне листа, выступающие, овальной формы, их окружают 4-5 околоустьичных клеток; паренхимные клетки содержат друзы оксалата кальция, которые очень заметны на просвете.
2. В листьях *Padus Grayanae Maxim* содержится комплекс биологически активных веществ: амигдалин, аскорбиновая кислота, флавоноиды, дубильные вещества, моно-, олиго- и полисахариды.
3. Наибольшее содержание в листьях *Padus Grayanae Maxim* БАВ отмечается в июле и августе, и, следовательно, указанные месяцы являются оптимальными для заготовки лекарственного сырья.

4. Разработана оптимальная лекарственная форма фитопрепарата из листьев изучаемого растения и методы его стандартизации.
5. Результаты морфологических, биохимических и токсикологических исследований показали, что полученный фитопрепарат является нетоксичным.

**Апробация диссертации**

Результаты проведенных исследований доложены и обсуждены на:

- II Съезде Российского Научного Общества фармакологов «Фундаментальные проблемы фармакологии» (Москва, 2003);
- IX Международной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы и перспективы развития медицины» (Бишкек, 2003);
- международном симпозиуме «Сохранение и устойчивое использование растительных ресурсов» (Бишкек, 2003);
- IX Международном конгрессе по клинической патологии и IV Всемирном конгрессе по астме (Бангкок, 2004).

**Сведения о внедрении.** На основании отчета о проведенных исследованиях получено разрешение Фармакологического комитета ДЛО и МТ МЗ КР на проведение клинических испытаний и на фитопрепарат получено регистрационное удостоверение.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 10 научных трудов, в том числе 9 статей.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 138 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследований, трех глав по результатам собственных исследований, заключения, выводов, библиографического указателя, который содержит 200 источников (159 отечественных и стран СНГ и 41 зарубежных авторов).

Текст диссертации иллюстрирован 20 таблицами, 15 рисунками, 2 хроматограммами, 28 микрофотографиями.

**Материалы и методы исследования.** Для решения поставленных задач использовались фармакологические, физиологические, биохимические, морфологические, фармакогностические, химические, физические, технологические, микробиологические, физико – химические методы исследования.

В экспериментальных исследованиях использовались 90 белых беспородных крыс – самцов с массой тела 110 – 250 г. Все животные содержались в обычных условиях вивария.

Острая токсичность исследуемого фитопрепарата изучалась на 30 белых беспородных крысах – самцах при однократном пероральном введении. Оценка результатов эксперимента проводилась через одни сутки после введения изучаемого фитозкстракта, учитывалось количество погибших животных (Беленький М.Л., 1963).

Хроническая токсичность исследуемого средства изучалась на 60 белых беспородных крысах – самцах при ежедневном пероральном введении в течение 1, 2 и 3 месяцев. Опыты проводились в соответствии с требованиями к доклиническому изучению общетоксического действия новых лекарственных веществ (Информационно – методическое пособие ФК ДЛО и МТ МЗ КР, Бишкек, 2001).

Изучение влияния фитозэкстракта на картину периферической крови проводилось по общепринятым методам (Козловская Л.В., Николаев А.Ю., 1985).

Для оценки ориентировочно – исследовательских реакций крыс применялась методика "открытого поля" (Воронина Т.А. и соавт., 1982). В течение двухминутного пребывания крыс в "открытом поле" регистрировалось: число перемещений из квадрата в квадрат (горизонтальные перемещения), число вставаний на задние лапки – вертикальные перемещения (локомоции), число заглядываний в отверстия, число умываний (груминг) и количество дефекаций.

Изучение влияния фитопрепарата на обмен веществ животных проводилось с помощью определения основных биохимических показателей в сыворотке крови: общий белок, мочевины, остаточный азот, холестерин, сахар крови по общеизвестным в лабораторной практике методам (Меньшиков В.В. и соавт., 1987).

Материалом для морфолого-анатомического изучения сырья служили свежие листья *Padus Grayanae Maxim.* Изучение внешних признаков изучаемого сырья проводилось согласно ГФ XI визуальным наблюдением с помощью лупы (x10). Анатомическое исследование листьев проводилось в соответствии со статьей ГФ XI с использованием необходимых реактивов и микроскопа МБИ – 18 с фотонасадкой (Carl Zeiss Jena, Германия) с увеличением  $\times 250$ .

В качестве материала для фитохимического изучения использовались высушенные измельченные листья. Для определения качественного и количественного содержания биологически активных веществ в листьях изучаемого растения использовались цветные реакции, фотоколориметрический, спектрофотометрический, титриметрический, гравиметрический методы исследования.

Для извлечения амигдалина из изучаемого лекарственного растительного сырья проводилась экстракция в 40% этаноле в соотношении 1:10. После выделения амигдалина проводился его кислотный гидролиз, затем образовавшийся цианистый водород удаляли отгонкой с водяным паром в течение 1 часа. Перегнанный таким образом цианистый водород поглощался едкой щелочью. В полученном отгоне определялись качественное и количественное содержание амигдалина по цианид – иону.

Качественная реакция на амигдалин проводилась по образованию берлинской лазури при добавлении кристаллика сульфата железа (II) и подкислении разбавленной серной кислотой.

Количественное содержание цианидов определялось фотометрическим методом с применением пиридина и барбитуровой кислоты, а содержание бензальдегида гравиметрическим методом [Лурье Ю.Ю. 1983, Международный стандарт ИСО 6703/2 – 84, Honig D.N. et.al. 1983, Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, ed. Kenneth Helrich, 15<sup>th</sup> edition, 1990].

Подлинность аскорбиновой кислоты устанавливалась различными цветными реакциями: с раствором нитрата серебра, 2,6-дихлорфенолиндофенола натрия и другими реактивами согласно ГФ XI СССР (1990). Для определения количественного содержания аскорбиновой кислоты в листьях изучаемого растения использовалась методика титрования с 2,6 дихлорфенолиндофенолом (ГФ XI СССР 1990).

Качественное определение дубильных веществ проводилось с помощью реакции с раствором свинца ацетата основного, железа окисного хлорида. Для количественного определения дубильных веществ наиболее широко используется перманганатометрический метод Левенталя (ГФ XI СССР, 1990). С применением данного метода танины определялись путем окисления их перманганатом калия в сильноразбавленных растворах в присутствии индигосульфокислоты.

Подлинность рутина определялась цветной реакцией с раствором гидроксида натрия, а также с порошком магнезия.

Для определения количественного содержания флавоноидов использовался спектрофотометрический метод с применением реакции комплексообразования с алюминия хлоридом в среде 40 % этанола (ГФ XI СССР, 1990).

Качественное и количественное содержание полисахаридов, моносахаридов, олигосахаридов, гемицеллюлозы и пектиновых веществ в образцах сырья определялось по методике Н.К. Кочеткова и др. (1981).

Для доказательства присутствия алкалоидов, при проведении качественных реакций, готовилось извлечение из листьев изучаемого растения с помощью подкисленной воды, и после его фильтрования проводились общие осадочные реакции с иодидами тяжелых металлов, кремневольфрамовой, фосфорновольфрамовой кислотами [Муравьева Д.А., 1991].

Для обнаружения сапонинов в изучаемом растении использовался метод пенообразования, основанный на способности водно – спиртовых вытяжек (1:10) из листьев *Padus Grayanae Maxim* при pH=5 – pH=6 образовывать пену различной высоты [Алимбаева П.К. и соавт., 1986].

Для определения доброкачественности лекарственного растительного сырья разрабатывались числовые показатели (влажность, общая зола, зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, степень измельченности,

примеси частиц сырья, утратившие окраску, присущую данному виду (побуревшие, почерневшие, выцветшие и т.д.); другие части этого растения, не соответствующие установленному описанию сырья; органическую примесь (части других неядовитых растений); минеральную примесь (земля, песок, камешки) согласно методике ГФ СССР XI (1990).

Микробиологическая чистота лекарственного растительного сырья и фитопрепарата определялась в асептических условиях с применением методов и питательных сред, приведенных в Государственной фармакопее СССР XI издания (1990), а также в дополнительных изменениях (1995; 2002; 2003).

Исследование стабильности изучаемого препарата проводилось согласно «Временной инструкции № 42-2-82 по проведению работ с целью определения сроков годности лекарственных средств на основе методов ускоренного старения при повышенной температуре» (Москва, 1983).

*Статистические методы.* Цифровой материал, полученный в результате экспериментальных исследований, подвергнут вариационно – статистической обработке в соответствии с требованиями, предъявляемыми к анализу фармакологического эксперимента с использованием критерия Стьюдента (Беленький М.Л., 1963; Лакин Г.Ф., 1990) с помощью персонального компьютера с применением статистических программ ("Statistica for Windows", 2001).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Лекарственным сырьем *Padus Grayanae Maxim*, рекомендуемым для применения, являются листья. Результаты наших исследований анатомо – морфологических характеристик листового аппарата *Padus Grayanae Maxim* позволили установить следующие *основные диагностические признаки*: клетки эпидермиса однорядные, довольно крупные и тонкостенные. У верхнего эпидермиса они имеют более извилистые боковые стенки. Извилины нижнего абаксиального эпидермиса часто заострены; устьица расположены на нижней стороне листа (гипостоматический лист), выступающие, овальной или продолговато – овальной формы, окружены 4 – 5 околоустьичными клетками. Устьичный комплекс дицитного или кариофиллоидного типа; мезофилл листа довольно плотный и гетерогенный. Палисадная паренхима состоит из 2 – 3 рядов клеток под верхним эпидермисом. Губчатая паренхима состоит из клеток разнообразной формы, очень рыхлая. Лист дорсовентральный или бифациальный. Клетки паренхимы содержат друзы (рафиды) оксалата кальция округлой формы; главная жилка проходит с нижней (абаксиальной) стороны со срединнорасположенным крупным проводящим пучком, с хорошо развитыми механическими тканями – колленхимой; черешок листа имеет округлое очертание, с нижней стороны вогнутый. Флоэма проводящих пучков черешка расположена с абаксиальной стороны, а ксилема к середине и имеет радиально расположенные сердцевинные лучи.

*Результаты фитохимических исследований показали (табл. 1), что в листьях Padus Grayanae Maxim содержится комплекс биологически активных веществ: амигдалин, аскорбиновая кислота, флавоноиды, дубильные вещества, моно-, олиго- полисахариды.*

Таблица 1.

Содержание биологически активных веществ (БАВ) в листьях *Padus Grayanae Maxim*

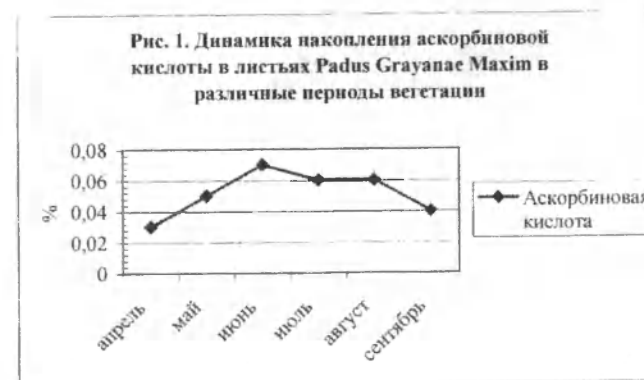
БАВ	Количественное содержание
Аскорбиновая кислота (%)	0,03 - 0,06
Амигдалин (по цианид – иону, мкг/л)	0,1295 – 0,1448
Дубильные вещества (%)	2,7 - 4,1
Флавоноиды (%)	0,2 - 0,29
Полисахариды (%)	8,5 - 9,5
Моносахариды (%)	6,5 - 9,3
Олигосахариды (%)	6,5 - 9,7
Пектиновые вещества (%)	3,5 – 5,0
Гемиллюлоза (%)	3,2 - 4,1

*Алкалоиды.* Общие осадочные реакции с иодидами тяжелых металлов, кремневольфрамовой, фосфорно-вольфрамовой и пикриновой кислотами на наличие алкалоидов показали, что в листьях *Padus Grayanae Maxim* алкалоидов не содержится.

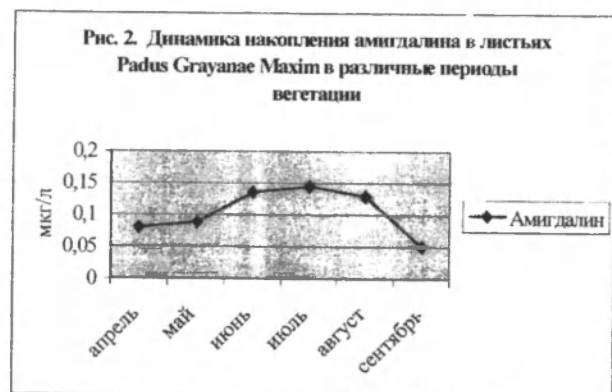
*Сапонины.* Наличие сапонинов определялось по степени пенообразования. Результат исследования был отрицательным.

Для установления оптимальных сроков сбора лекарственного сырья нами проводилось изучение динамики накопления аскорбиновой кислоты, амигдалина, флавоноидов, дубильных веществ, моно-, олиго- и полисахаридов в листьях в различные периоды вегетации изучаемого растения.

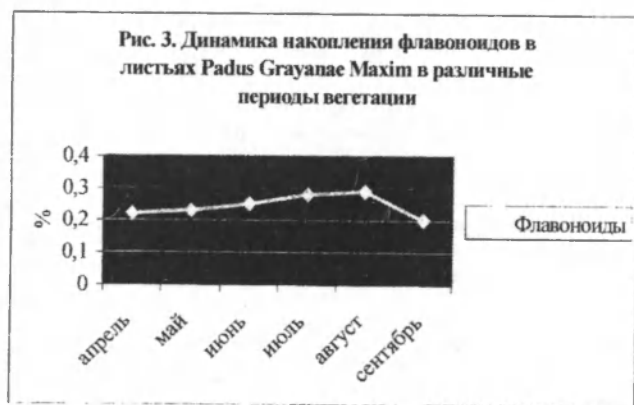
Максимальное накопление в лекарственном сырье аскорбиновой кислоты и амигдалина приходится на июнь-июль-август месяцы (рис. 1, 2).



При этом содержание указанных веществ превышает их содержание в сырье в апреле месяце более чем в 1,5-2 раза.



Установлено, что содержание флавоноидов в лекарственном сырье постепенно нарастает, начиная с апреля, достигая максимума в августе. В сентябре регистрируется снижение содержания флавоноидов до значений апреля месяца (рис. 3).



Результаты проведенных исследований показали, что динамика накопления в изучаемом лекарственном сырье дубильных веществ, полисахаридов, олигосахаридов и моносахаридов имеет одинаковую направленность (рис.4.).

Количественное содержание указанных биологически активных веществ в листьях *Padus Grayanae Maxim* начинает увеличиваться с мая месяца, достигая своего максимума в августе. В сентябре содержание этих биологически активных веществ уменьшается, при этом содержание дубильных веществ и олигосахаридов практически достигает значений апреля месяца. Снижение содержания в сырье полисахаридов и моносахаридов в сентябре происходит в меньшей степени, чем дубильных веществ и олигосахаридов. Так, содержание полисахаридов в листьях изучаемого растения в сентябре превышает значения апреля в 2 раза, а содержание моносахаридов – в 1,26 раза



Таким образом, исследования по изучению накопления физиологически активных веществ в зависимости от периода вегетации *Padus Grayanae Maxim* показали, что их наибольшее содержание в листьях изучаемого растения отмечается в июле и августе, и, следовательно, указанные месяцы являются оптимальными для заготовки лекарственного сырья.

Для стандартизации лекарственного сырья *Padus Grayanae Maxim* нами предлагается использовать внешние признаки, анатомо – диагностические признаки, качественные реакции на биологически активные вещества (амигдалин, дубильные вещества), числовые показатели, а также показатели микробиологической чистоты согласно требованиям НД.

Получение фитопрепарата из *Padus Grayanae Maxim* осуществлялось методом экстракции и состояло из следующих стадий: подготовка лекарственного растительного сырья и экстрагента, экстрагирование лекарственных веществ из растительного материала, очистка извлечения, стандартизация готового продукта.

*Выбор экстрагента.* В результате фитохимических исследований сырья было установлено, что содержащиеся в нем биологически активные вещества, преимущественно относятся к группе гидрофильных соединений, на основании чего в качестве экстрагента нами использовался этанол в разных концентрациях.

Для определения оптимальной концентрации этанола, которая обеспечивает максимальный выход биологически активных веществ из листьев *Padus Grayana Maxim*, нами проводились исследования, результаты которых отражены в таблице 2.

Таблица 2.

Выход биологически активных веществ из лекарственного сырья в зависимости от концентрации применяемого экстрагента (этанол)

БАВ	Концентрация экстрагента (этанол)		
	70%	60%	40%
Аскорбиновая кислота (%)	0,03	0,04	0,07
Амигдалин (по цианид – иону, мкг/л)	0,0795	0,0805	0,0995
Дубильные вещества (%)	9,0	6,5	4,1
Полисахариды (%)	2,2	4,1	9,5
Флавоноиды (%)	0,19	0,25	0,27

Проведенные эксперименты показали, что чем выше концентрация этанола (60%;70%), тем больше выход дубильных веществ (рис. 5), которые, как известно, в некоторых случаях могут препятствовать всасыванию других действующих веществ из желудочно – кишечного тракта, соответственно снижая биодоступность препарата [Холодов Л.Е., Яковлев В.П., 1985; Муравьева Д.А, 1991; Михайлов И.Б., 2003].

В то же время при уменьшении концентрации этанола наблюдалось, в разной степени выраженное, увеличение выхода биологически активных веществ из изучаемого сырья. Так, уменьшение концентрации этанола с 70% до 60% увеличило выход полисахаридов практически в 2 раза. При использовании 40% этанола выход полисахаридов увеличился в 2,3 раза по сравнению с использованием 60% этанола и в 4,3 раза по сравнению с использованием 70% экстрагента (рис 5).

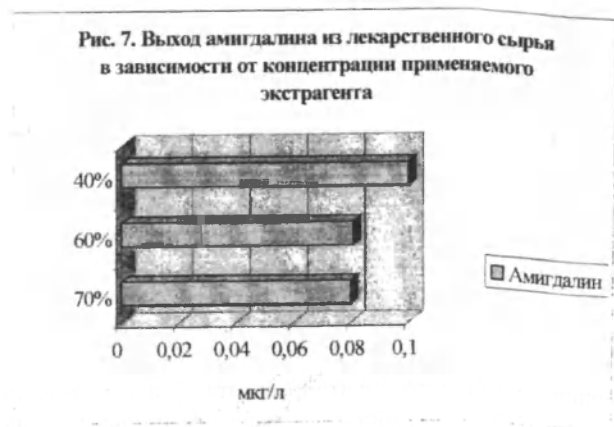


Как видно из рис. 6, использование 60% экстрагента увеличивает выход флавоноидов из сырья на 31,6%, по сравнению с применением 70% этанола. При использовании 40% этанола выход из сырья флавоноидов увеличился на 42%.

Применение 60% экстрагента увеличивало выход аскорбиновой кислоты из сырья на 33,3%, по сравнению с применением 70% этанола. При использовании 40% этанола выход из сырья аскорбиновой кислоты резко возрастал и достигал 0,07%, т.е. увеличился в 2,5 раза, по сравнению с использованием 70% этанола (рис. 6).



При использовании 70% и 60% этанола выход из сырья амигдалина (по цианид – иону) был практически одинаков, уменьшение концентрации этанола до 40% приводило к увеличению выхода амигдалина (по цианид – иону) на 20% (рис 7).



Таким образом, из полученных данных следует, что использование в качестве экстрагента 40% этанола позволяет получить максимальный выход из сырья биологически активных веществ при минимальном выходе дубильных веществ. Следовательно, указанная концентрация этанола и является оптимальной для получения галенового препарата из надземных частей *Padus Grayana Maxim.*

Для приготовления 1 л фитопрепарата в соотношении сырья к экстрагенту 1:10 использовалась нужная навеска листьев *Padus Grayanae Maxim.*, измельченных до размера частиц в 2 мм, и этанол, количество которого рассчитывалось с учетом коэффициента поглощения ( $K=3$ ). После чего проводилось намачивание сырья половинным количеством экстрагента по отношению к массе сырья, в течение 4-5 ч без перемешивания. Набухший материал загружался в экстрактор достаточно плотно, чтобы в сырье оставалось как можно меньше воздуха. Сверху растительный материал покрывался куском полотна, прижимался перфорированным диском и заливался 40% этанолом. Экстракция проводилась в течение 6 суток. После чего получается готовый продукт, сырье выгружается и отжимается.

Очистка фитопрепарата осуществлялась путем отстаивания в течение 3 суток при температуре не выше 8°C и последующим фильтрованием.

Стандартизация полученного фитопрепарата проводилась по качественному и количественному содержанию биологически активных веществ (амигдалин, дубильные вещества), концентрации этанола, сухому остатку, величине pH, содержанию тяжелых металлов. Кроме того, определялась его микробиологическая чистота.

Результаты испытания текущей стабильности полученного фитопрепарата методом ускоренного старения при повышенной температуре позволили установить его срок годности - 2 года.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами разработана технология получения нового оригинального фитопрепарата из листьев *Padus Grayanae Maxim* и методы его стандартизации.

Следующим этапом работы явилось проведение доклинического изучения токсикологических характеристик и фармакологических свойств полученного фитопрепарата. Острая токсичность определялась на 30 белых беспородных крысах – самцах при однократном пероральном введении максимального объема фитопрепарата, изготовленного в соотношении сырья к извлекателю 1: 5 и 1:10.

Результаты экспериментов показали, что введение животным перорально фитопрепарата, приготовленного в соотношении 1:10, не вызывало каких либо видимых изменений в их поведении.

При применении изучаемого фитопрепарата, приготовленного в соотношении 1:5, через 30 – 45 минут у экспериментальных животных отмечалось учащение дыхания, уменьшение двигательной активности. Однако,

описанные явления почти полностью исчезали через 2 часа после введения изучаемого препарата. Летальных исходов в течение 7 дней наблюдения за животными отмечено не было. В связи с этим ЛД<sub>50</sub> изучаемого фитопрепарата в указанных соотношениях установить не удалось.

Таким образом, результаты экспериментов по изучению острой токсичности фитопрепарата *Padus Grayanae Maxim* позволяют сделать вывод, что изучаемый фитопрепарат практически нетоксичен.

Для изучения хронической токсичности исследуемый фитопрепарат вводился внутрь один раз в сутки в течение 1 – 3 месяцев в дозах 0,25 и 0,5 мл/100 г массы тела животного. Во время исследования учитывались следующие показатели: изменения в общем состоянии животных, ректальная температура, изменения массы тела животных, количество гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, цветной показатель в периферической крови, изменения со стороны центральной нервной системы, а также некоторые биохимические показатели, характеризующие состояние углеводного, белкового и липидного обменов.

Общее состояние животных в течение проведения опыта было удовлетворительным. Состояние шерстного покрова было без изменений, как у контрольных, так и опытных крыс. Также в ходе эксперимента измерялась ректальная температура животных, которая в течение опыта оставалась в пределах исходного уровня.

Для изучения влияния фитопрепарата *Padus Grayanae Maxim* на функции центральной нервной системы были изучены поведенческие реакции экспериментальных животных. Для оценки ориентировочно – исследовательского поведения животных использовали методику "открытого поля". С этой целью перед проведением опыта исследовались исходные данные путем тестирования животных в "открытом поле" в течение двух минут. Регистрировались горизонтальные и вертикальные перемещения, заглядывания в отверстия, груминг и количество дефекаций. Полученные исходные данные сравнивались с показателями через 1 и 3 месяца. Результаты экспериментов показали, что во все сроки наблюдения отмечалась тенденция к снижению исследовательских реакций (число заглядываний в отверстия), уровня общей активности (горизонтальные и вертикальные перемещения), уменьшению эпизодов груминга и числа дефекаций. Однако, все эти изменения поведения крыс опытных групп в "открытом поле" не имели статистически значимых отличий от показателей животных контрольных групп.

Количество гемоглобина во все периоды эксперимента, по сравнению с исходными данными, увеличивалось у всех экспериментальных животных. Однако, увеличение количества гемоглобина в периферической крови было достоверным только у животных, получавших изучаемый препарат в дозе 0,25 мл/100 г массы тела ( $P < 0,001$ ). У животных остальных групп наблюдения это увеличение было недостоверным. Количество эритроцитов в периферической



крови и цветной показатель у экспериментальных животных во все сроки эксперимента оставалось на уровне исходных значений.

Результаты исследований показали, что у крыс II и III групп, получавших препарат в изучаемых дозах в течение 1 месяца, отмечено значительное и достоверное увеличение количества лейкоцитов в периферической крови.

На наш взгляд, это указывает на стимуляцию клеточного звена иммунитета, что подтверждают и данные морфологического исследования. Так, под влиянием фитопрепарата *Padus Grayana Maxim* в дозах 0,25 и 0,5 мл/100 г массы тела животного в течение 1 месяца при гистологическом исследовании было установлено усиление активности органов иммунной защиты (тимуса, селезенки, лимфатических узлов).

Увеличение числа лейкоцитов в периферической крови наблюдалось и у животных V и VI групп, получавших препарат в изучаемых дозах в течение 3 месяцев. Однако, в отличие от животных, получавших изучаемый препарат в течение 1 месяца, это увеличение было недостоверным. По – видимому, это связано с тем, что введение изучаемого фитопрепарата в течение 3 месяцев приводит к некоторому функциональному перенапряжению органов иммунной системы.

Недостоверны были и отличия в содержании лейкоцитов в периферической крови между животными контрольной и опытных групп, получавших препарат в течение 3 месяцев.

Изучение влияния исследуемого препарата на некоторые биохимические показатели сыворотки крови, в частности, уровень общего белка, холестерина, глюкозы, мочевины, остаточного азота проводилось у животных, забитых декапитацией.

В результате проведенных исследований установлено, что у крыс получавших фитопрепарат в изучаемых дозах в течение 1 и 3 месяцев наблюдалось статически значимое увеличение количества общего белка в сыворотке крови. Наибольшее увеличение содержания общего белка в сыворотке крови отмечено в группе животных, получавших фитопрепарат в дозе 0,25 мл/100 г массы тела в течение одного месяца.

Увеличение количества общего белка в сыворотке крови животных под влиянием изучаемого фитопрепарата, по-видимому, связано со стимуляцией белковообразующей функции печени и увеличением синтеза иммуноглобулинов, которые участвуют в реакциях гуморального иммунитета. Иммуномодулирующая активность фитοэкстрактов *Padus Grayanae Maxim* ранее была показана в работах Зурдинова А.З. и соавторов (1997, 1998) и Куттубаевой К.Б. и соавторов (2000, 2001, 2002).

При введении фитопрепарата *Padus Grayanae Maxim* в изучаемых дозах в течение 1 и 3 месяцев наблюдалось статически достоверное снижение уровня

холестерина и глюкозы, свидетельствующее о влиянии изучаемого препарата на липидный и углеводный обмен экспериментальных животных.

Причем, снижение количества холестерина и глюкозы в сыворотке крови экспериментальных животных было выражено практически в равной степени у крыс, получавших препарат в течение 1 и 3 месяцев. Эти данные позволяют констатировать наличие у фитопрепарата *Padus Grayanae Maxim* гипополипидемического и гипогликемического действия. Возможно, эти эффекты изучаемого препарата связаны с метаболическими эффектами амигдалина, содержание которого в 1 мл водно-спиртового извлечения листьев изучаемого лекарственного сырья (по цианид-иону после кислотного гидролиза) колеблется от 0,0000882 мкг до 0,001095 мкг.

Из данных литературы (Дудченко Л.Г., Кривенко В.В., 1985) известно, что амигдалин снижает уровень холестерина в крови, повышает резистентность кровеносных сосудов. Наличие гепатозащитного действия амигдалина отмечено также в работах Шнайдемана Л.О. и соавт. (1971), Туровой А.Д., Сапожниковой Э.Н. (1983).

Кроме того, имеются данные, что амигдалин обладает способностью повышать устойчивость организма к гипоксии, участвует в восстановлении сульфгидрильных групп и защите жиров от перекисления [Ковалева Н.Г., 1972; Турова А.Д., Сапожникова Э.Н., 1983; Зинченко Т.В. и соавт., 1990].

Изучение влияния фитопрепарата на морфологическую структуру внутренних органов экспериментальных животных показало, что в дозах 0,25 и 0,5 мл/100 г массы тела животного в течение 1 месяца он не оказывает токсического действия на внутренние органы животных.

При этом были выявлены изменения, свидетельствующие об усилении активности органов иммунной защиты (тимуса, селезенки, лимфатических узлов и лимфоидных фолликулов дыхательной и пищеварительной систем). Во всех остальных органах отмечались признаки усиления кровоснабжения.

На фоне длительного (в течение 3 месяцев) введения изучаемого фитопрепарата в дозах 0,25 и 0,5 мл/100г массы тела животного в печени отмечаются незначительные дистрофические явления (пикноз ядер гепатоцитов, микронекрозы).

При этом в органах иммунной системы отмечались признаки функционального перенапряжения. В остальных органах введение препарата в дозах 0,25 и 0,5 мл/100г массы тела животного в течение 3 месяцев приводило к значительному усилению кровоснабжения.

Иммуномодулирующее действие изучаемого фитопрепарата, очевидно, обусловлено наличием в нем комплекса биологически активных соединений. Среди веществ, обнаруженных в листьях *Padus Grayanae Maxim*, важнейшая роль может принадлежать полисахаридам, флавоноидам и витамину С. Как известно, водорастворимые полисахариды стимулируют клеточную иммунную

систему, а жирорастворимые компоненты усиливают фагоцитоз [Садова О.М. и соавт., 1998; Bukovsky M. et. al., 1993; Bauer R. et. al., 1999].

Одним из важных условий эффективного использования иммунокорректоров является подготовка организма к восприятию действия иммуномодулятора, так называемая предварительная «экстраиммунная» терапия [Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., 1998], включающая рациональное питание и прием веществ, являющихся источниками энергии для клеток иммунной системы, обеспечивающих их последующую активацию и эффекторную функцию в процессе иммунного ответа. К последним относятся и моно-, олиго- и полисахариды, так как процессы выработки энергии в лейкоцитах при их активации идут преимущественно по пентозо-фосфатному шунту. Как было отмечено выше, в изучаемом фитопрепарате содержание полисахаридов в разных пробах изучаемого сырья составляет от 4,5% до 9,5%.

Из вышеизложенного следует, что наиболее сбалансированными по составу можно считать иммуномодуляторы растительного происхождения с достаточным содержанием сложных сахаров, что и характерно для изучаемого фитоекстракта. Кроме того, в нем содержится флавоноиды (в основном рутин и кверцетин), содержание которых в листьях *Padus Grayanae Maxim* колеблется в диапазоне 0,2% – 0,29%. Согласно данным Bukovsky M. et. al, (1993) и Bauer R. et. al. (1999) флавоноиды улучшают предпосылки эффективного иммунного ответа за счет антиоксидантного, желчегонного, гипохолестеринемического, мембраностабилизирующего (блокада фосфолипазы А2), антиаллергического (блокада 5-липоксигеназы и образования лейкотриенов) действия.

Как показали наши исследования, количественное содержание аскорбиновой кислоты в изучаемом лекарственном растении составило 0,03% – 0,07%. В ряде исследований, выполненных в последние годы, было показано, что в присутствии витамина С лейкоциты крови способны вырабатывать оксид азота, благодаря которому развиваются защитные реакции организма в отношении опухолевых, бактериальных и других чужеродных клеток [Базарова В.И. и соавт., 1998]. Очевидно, присутствие данного витамина также имеет немаловажную роль в проявлении фармакологических эффектов изучаемого фитопрепарата.

Таким образом, в результате проведенных исследований получены новые данные по анатомии и морфологии листьев *Padus Grayanae Maxim* и накоплении биологически активных веществ в них в зависимости от сроков вегетации, установлены оптимальные сроки заготовки, стандартизации лекарственного растительного сырья и разработана ВФС (68-39.1 –03).

На основании полученных данных разработана нормативная документация и технология получения нового оригинального растительного иммуномодулятора из местного растительного сырья, технология его получения и методы

стандартизации галенового препарата *Padus Grayanae Maxim*. Разработана нормативно-техническая документация (ВФС) на него.

Проведено доклиническое изучение фармакологических свойств и токсикологических характеристик галенового препарата из *Padus Grayanae Maxim*.

Лекарственное сырьё и фитопрепарат *Padus Grayanae Maxim* – «ИММУНАЗ» официально зарегистрированы в Департаменте лекарственного обеспечения и медицинской техники МЗ Кыргызской Республики.

## ВЫВОДЫ

1. Установлены качественные и количественные характеристики содержания биологически активных веществ в листьях *Padus Grayanae Maxim*.
2. Оптимальным периодом заготовки лекарственного сырья *Padus Grayanae Maxim* является июль - август, так как в указанные месяцы отмечается максимальное накопление физиологически активных веществ в его листьях.
3. Стандартизация лекарственного растительного сырья (листья) *Padus Grayanae Maxim* проводится по основным анатомо-морфологическим признакам, качественному и количественному содержанию амигдалина и дубильных веществ, числовым показателям и микробиологическим параметрам.
4. Разработана технология получения нового оригинального фитопрепарата *Padus Grayanae Maxim* и методы его стандартизации.
5. ЛД<sub>50</sub> фитопрепарата *Padus Grayanae Maxim* не удалось установить, что свидетельствует о его практической нетоксичности.
6. Фитопрепарат *Padus Grayanae Maxim* при введении в течение 1 и 3 месяцев не влияет на общее состояние и поведение животных, вызывает увеличение содержания лейкоцитов в периферической крови животных, снижение уровня глюкозы и холестерина в сыворотке крови.
7. Морфо – функциональное состояние внутренних органов экспериментальных животных на фоне введения изучаемого фитопрепарата в течение 1 месяца практически не изменилось.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Морфолого – анатомические методы диагностирования листьев *Padus Grayanae Maxim* // Сборник научных трудов, посвященный 75 – летию д.м.н., профессора М.Т. Нанаевой "Лекарства и здоровье населения". – Бишкек, 2002. – С. 198 – 201 (соавт.: Зурдинова А.А., Шалпыков К.Т.).
2. Качественное и количественное определение амигдалина в настойке *Padus Grayanae Maxim* // Сборник научных трудов, посвященный 75 – летию д.м.н., профессора М.Т. Нанаевой "Лекарства и здоровье населения". – Бишкек, 2002. – С. 205 – 210 (соавт.: Зурдинов А.З., Джумаев И.А.).

3. Динамика накопления биологически – активных веществ в зависимости от периода вегетации *Padus Grayanae Maxim* //Материалы Международного симпозиума "Сохранение и устойчивое использование растительных ресурсов". – Бишкек, 2003. – С.130 – 134 (соавт.: Зурдинов А.З., Сабирова Т.С., Зурдинова А.А.).
4. Стандартизация лекарственного сырья из *Padus Grayanae Maxim* //Материалы Международного симпозиума "Сохранение и устойчивое использование растительных ресурсов". – Бишкек, 2003. – С.125 – 130 (соавт.: Зурдинов А.А., Шалпыков К.Т., Андрейченко Л.М.).
5. Фармакогнозия и фитохимия *Padus Grayanae Maxim* //Материалы IX итоговой конференции молодых ученых. Центральное – Азиатский Медицинский Журнал. – Бишкек, 2003. - Том IX. – С. 201 – 203.
6. Фитопрепарат из *Padus Grayanae Maxim* //Материалы IX итоговой конференции молодых ученых. Центральное – Азиатский Медицинский Журнал. – Бишкек, 2003. - Том IX – С. 199 – 201 (соавт.: Зурдинова А.А.).
7. Влияние нового оригинального фитопрепарата на морфофункциональное состояние внутренних органов экспериментальных животных // Известия ВУЗов. – Бишкек, 2003. – С. 87 – 94 (соавт.: Зурдинов А.З., Заречнова Н.Н.).
8. Влияние нового оригинального препарата растительного происхождения на морфофункциональное состояние иммунокомпетентных органов // Известия ВУЗов. – Бишкек, 2003. – С. 95–101 (соавт.: Зурдинова А.А., Заречнова Н.Н.).
9. О новом оригинальном фитопрепарате с иммуномодулирующей активностью //Сборник тезисов 2-го Съезда Российского Научного Общества фармакологов "Фундаментальные проблемы фармакологии". –Москва, 2003. – часть I –С.216.
- 10.Микроскопическая характеристика листьев черемухи Грея // Фармация. - Москва, 2004. - № 2. –С. 16-18.

#### АННОТАЦИЯ

диссертации Исмаилова Исабека Зайлидиновича  
**«Фармакогностические особенности и фармакологические свойства *Padus Grayanae Maxim*», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальностям 15.00.01. – «технология лекарства и организация фармацевтического дела»; 14.00.25. – «фармакология, клиническая фармакология»**

В диссертационной работе приведены результаты изучения фармакогнозии и фитохимии *Padus Grayanae Maxim*. Для определения подлинности лекарственного растительного сырья установлены основные диагностические признаки листьев. Показано, что в них содержится комплекс биологически активных веществ: амигдалин, аскорбиновая кислота, флавоноиды, дубильные вещества, моно-, олиго- полисахариды, установлено их количественное содержание в лекарственном сырье. Исходя из показателей максимального накопления БАВ в листьях изучаемого растения, установлены оптимальные сроки заготовки лекарственного сырья.

Разработана технология получения нового оригинального фитопрепарата, обладающего иммуномодулирующими свойствами, и методы его стандартизации. Доклиническое изучение показало, что он практически нетоксичен, не оказывает отрицательного действия на внутренние органы животных, вызывая при этом усиление активности органов иммунной защиты.

Введение фитопрепарата в дозах 0,25 и 0,5 мл/100 г массы тела животного в течение 1 и 3 месяцев не влияет на общее состояние и поведение животных; вызывает увеличение содержания лейкоцитов в периферической крови, снижение уровня глюкозы и холестерина в сыворотке крови.

Результаты проведенных исследований были использованы при разработке ВФС на лекарственное сырье и фитопрепарат, получено регистрационное удостоверение в ДЛО и МТ МЗ КР на иммуномодулирующее средство.



#### ANNOTATION

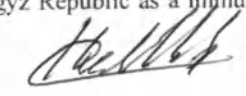
**of the dissertation of «Pharmacognostic peculiarities and pharmacologic properties of *Padus Grayanae Maxim*» presented by Isabek Zailidinovich Ismailov for competition of Ph.D. scientific degree of Pharmaceutical Science on specialities 15.00.01. - «Drug technology and pharmaceutical management»; 14.00.25- «Pharmacology, Clinical Pharmacology»**

Results of studies of pharmacognosy and phytochemistry of *Padus Grayanae Maxim* are presented in the dissertation. For identification of originality of the raw crude drug the basic diagnostic features have been set. The complex of bioactive substances: amygdalin, ascorbic acid, flavonoids, tanning agents, mono- and oligo- and polysaccharides, and their quantitative contents in the crude drug have been shown. The optimal terms for logging of the crude drug have been set on the base of the rates of maximum accumulation of biologically active substance in the leaves of the studied plant.

The technology of getting of the new original plant drug producing immunostimulant properties and methods of its standardization has been elaborated. Preclinical studies testified that it is absolutely non-toxic, does not have any negative influence to internal organs of animals and causes improvement of immune defense organs activity.

Injection of the drug in doses 0,25 and 0,5 ml/100g of animal body weight during 1 and 3 months does not influence on their general state and behaviour, causes of increasing of leukocyte number in peripheral blood, and decreasing of glucose level and cholesterol concentration in the serum.

Results of the studies were used in the working out of normative documents on the drug crude and plant drug. The certificate of the Department of Drug Supply and Medical Equipment under the Health Ministry of the Kyrgyz Republic as a immune modulating drug has been obtained.




**Исмаилов Исабек Зайлидиновичтин**

**15.00.01. – «дарылардын технологиясы жана фармацевтикалык иштерди уюштуруу»; 14.00.25. – «фармакология, клиникалык фармакология» тармактары боюнча фармацевтика илимдерине кандидаттык даражасына арналган «*Padus Grayanae Maxim* дарагынын фармакогностикалык өзгөчөлүгү жана фармакологиялык касиеттери» аттуу диссертациясынын**  
**КЫСКАЧА МААНИСИ**

Диссертациялык иште *Padus Grayanae Maxim* дарагын фармакогностикалык жана фитохимиялык жактан изилдөөлөрдүн жыйынтыгы келтирилген. Дары алынуучу чийки зат катары колдонулуучу анын жалбырактарынын нактыгын аныктоочу негизги белгилери такталды. Изилдөөлөрдүн негизинде аларда биологиялык активдүү заттар: амигдалин, аскорбин кислотасы, флавоноиддер, танин, ар түрдүү кант заттары бар экендиги жана алардын өлчөмү аныкталды. Жогоруда белгиленген биологиялык заттардын көп өлчөмдө чогулган учуруна жараша дары алуу үчүн бул дарактын жалбыктарын чогултуу учуру такталды.

Окшоштугу жок, жаңыдан алынган, иммунитетти калыбына келтирүүчү бул өсүмдүк дарысын алуу жолдору жана аны стандартташтыруунун ыкмасы иштелип чыкты. Жүргүзүлгөн тажрыйбалар бул дары иш жүзүндө зыянсыз экендигин, жаныбарлардын ички органдарына терс таасир тийгизбегендигин жана ошону менен катар иммунитетке байланышкан органдардын активтүүлүгүн күчөтүүсүн көрсөтүштү.

Алынган өсүмдүк дарысы 0,25 жана 0,5 мл/100 г өлчөмүндө 1 айдан 3 айга чейин жаныбарларга берилгенде алардын жалпы абалына, кыймыл-аракетине таасир көрсөтпөйт жана ак кан денечелеринин санын көбөйтөт, кандын сывороткасындагы канттын, холестериндин денгээлин төмөндөтөт.



---

Издательский Центр КГМА  
720020, г. Бишкек, ул. Ахунбаева, 92  
тираж 100 экз.