

*На правах рукописи*

ДАВЫДОВА ВИКТОРИЯ ВЛАДИМИРОВНА

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ КОРИАНДРА  
ПОСЕВНОГО ТРАВЫ (CORIANDRUM SATIVUM L. HERBA) ПРИ  
ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ

**14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Волгоград – 2018

Диссертационная работа выполнена в Пятигорском медико-фармацевтическом институте – филиале Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель:**

**Василенко Юрий Киприанович**, доктор медицинских наук, профессор кафедры биологии и физиологии с курсами биологической химии и микробиологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

**Официальные оппоненты:**

**Чучалин Владимир Сергеевич**, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

**Батищева Галина Александровна**, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г. в \_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России (400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на сайте ([www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru)) ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте [www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru).

Автореферат разослан «\_\_» «\_\_\_\_\_» 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

**Бугаева Любовь Ивановна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Токсическое поражение печени является одним из самых распространенных этиологических факторов гепатобилиарной патологии. Это обусловлено абсолютным ростом контактов с гепатотоксичными ксенобиотиками: средствами бытовой, промышленной и сельскохозяйственной химии. К настоящему времени известно более 80000 таких соединений. Повреждение печени часто возникает у токсикоманов (Ильченко Л.Ю. и соавт., 2003) и при злоупотреблении алкоголем (Музалевская Е.Н. и соавт., 2013; Калинин А.В., 2012), причем доля алкогольного гепатоза составляет 60–70% от всех токсических поражений органа (Кильметова И.Р. и соавт., 2013). Существенное значение в развитии токсического поражения печени имеет длительное и бесконтрольное применение лекарственных средств, которое является причиной 40% гепатитов у больных старше 40 лет (Ильченко Л.Ю., Корович Т.И., 2013; Казюлин А.Н., Переяслова Е.В., 2012; Логинов А.Ф. и соавт., 2016; Мусин А.Г. и соавт., 2014; Трухан Д.И., Мазуров А.Л., 2016). В этом смысле наибольшую опасность представляют препараты следующих фармакологических групп: антибиотики (Буеверов А.О. и соавт., 2015; Суханов Д.С. и соавт., 2012; Скакун Н.П., Олейник А.Н., 1984; Bustos P.S. et al., 2016), противотуберкулезные препараты (Бобоходжаев О. и соавт., 2014; Вольф С.Б., 2016; Мордык А.В. и соавт., 2015; Можокина Г.Н. и соавт., 2014), противоопухолевые препараты (Карпова Г.В. и соавт., 2009; Ватутин Н.Т. и соавт., 2016) и НПВС (Пахомова И.Г. и соавт., 2014; Фролов Б.А. и соавт., 2013).

Указанные экзогенные факторы обладают не только своим специфическим механизмом альтерации, но инициируют в гепатоцитах универсальный и мощный механизм эндогенного повреждения в виде оксидантного стресса (Генинг Т.П., Ксейко Д.А., 2012; Палковский О.Л., 2008; Dou X. et al., 2013; Maruf A.A. et al., 2015; Wu D., Cedebraum A.I., 2003). Его продукты – агрессивные и многочисленные кислородные метаболиты являются причиной метаболических расстройств, мембранопатий, функциональных

нарушений, мутаций, ускоренного апоптоза и других форм клеточной патологии (Кондратова Л.А., Золотавина М.Л., 2015; Лелевич С.В., 2016; Оковитый С.В., Радько С.В., 2015; Сомова Т.Ю., 2010).

Большинство лекарственных препаратов, применяемых при токсических гепатопатиях, действуют достаточно избирательно, обеспечивая главным образом процесс регенерации мембран гепатоцитов (эссенциале, эплир, липостабил) или их паренхимы (цитидин, метилметионинсульфония хлорид, оротовая кислота, пангамат кальция, метионин, уридин, цианокобаламин). Вместе с тем многофакторность токсических поражений печени требует от лекарственных препаратов наличие многоуровневой защиты, которой обладают лишь немногие гепатопротекторы (легалон, силибор, гепатон) (Ажунова Т.А. и соавт., 2008; Коновалова В.В., Андреева Н.Л., 2014; Куркин В.А. и соавт., 2016; Топчий Н.В. и соавт., 2013; Топчий Н.В., Топорков А.С., 2016; Губергриц Н.Б. и соавт., 2012; Фадеенко Г.Д., Чернова В.М., 2011). Характерными свойствами современных гепатопротекторов являются: происхождение из растительного сырья и содержание полифенольных соединений (флавоноидов, флаволигнанов, коричных кислот и др.), обладающих антиоксидантной активностью (Сапко О.А. и соавт., 2016; Хома Р.Е. и соавт., 2014; Немцова Е.Р. и соавт., 2006; Дашинамжилов Ж.Б., 2015; Батуева Ю.А. и соавт., 2015; Филиппенко Т.А., Грибова Н.Ю., 2012). В этой связи, следует считать актуальным изучение гепатопротекторного и желчегонного действия извлечений из кориандра посевного содержащего полифенольные соединения, с целью создания на его основе различных лекарственных препаратов для терапии заболеваний печени.

### **Степень разработанности проблемы**

В последние годы интерес к препаратам лекарственных растений неуклонно растет. Причинами этого является высокая биологическая активность, низкая токсичность и меньшая вероятность проявления побочных эффектов, по сравнению с лекарственными средствами синтетического происхождения. Растительные объекты могут оказаться перспективным источником для получения гепатопротекторов или могут быть применены в

комплексной фармакотерапии заболеваний органов гепатобилиарной системы. Полифенольные соединения, получаемые из растительных объектов, обладают широким спектром фармакологической активности: противовоспалительной, антиаллергической, антиоксидантной, спазмолитической, антиатеросклеротической, кардиостимулирующей, противовирусной, гепатопротекторной и др (Комиссаренко Н.Ф. и соавт., 1993; Александрова А.Е. и соавт., 2005; Турсыматова О.И., Дильмаханова М.М., 2015; Parhiz H. et al., 2015; Li H. et al., 2004; Li B. et al., 2015; Panche A.N. et al., 2016; Nicholson S.K. et al., 2010). В ряде исследований доказана их эффективность в лечении поражений печени и желчевыводящих путей (Кушнерова Н.Ф. и соавт., 2014; Маев И.В. и соавт., 2012; Сергеева Е.О. и соавт., 2015; Кильметова И.Р. и соавт., 2012).

Активно исследуются гепатопротекторные свойства растительных препаратов и зарубежными учеными (Bouroгаа E. et al., 2015; Kim T.W. et al., 2016; Nwozo S.O. et al., Oyinloye B.E., 2011; Onoja S.O. et al., 2015). В этой связи, перспективным источником, содержащим полифенольные соединения, является кориандр посевной (*Coriandrum sativum* L.), для которого имеются данные о гепатопротекторной активности эфирных масел, листьев, и плодов в составе различных сборов (Суханов А.И., 2000; Samojlik I. et al., 2010; Momin A.H. et al., 2012), но экспериментальных доказательств гепатопротекторного и желчегонного действия отдельно взятого сырья не имеется.

### **Цель исследования**

Экспериментальное обоснование гепатопротекторных свойств извлечений из кориандра посевного травы в условиях острого токсического поражения печени тетрахлорметаном и этанолом.

### **Задачи исследования**

1. Изучить острую токсичность водного и 40%-спиртового извлечений из кориандра посевного травы и выявить особенность их влияния на детоксицирующую функцию печени при поражении тетрахлорметаном.

2. Определить эффективную терапевтическую дозу водного и 40%-спиртового извлечений кориандра посевного травы при пероральном введении на модели тетрахлорметанового гепатита.
3. Изучить влияние водного и 40%-спиртового извлечений из кориандра посевного травы на желчевыделительную функцию печени у интактных животных и в условиях тетрахлорметанового гепатита.
4. Провести изучение гепатозащитного действия водного и 40%-спиртового извлечений из кориандра посевного травы при пероральном введении на модели поражения печени тетрахлорметаном по комплексу биохимических показателей и гистологической картине печени в сравнении с Карсилом, Хофитолом, и аналогичными извлечениями из кукурузных рылец.
5. Провести изучение гепатозащитного действия водного и 40%-спиртового извлечений из кориандра посевного травы при пероральном введении на модели поражения печени этанолом по комплексу биохимических показателей и гистологической картине печени в сравнении с Карсилом, Хофитолом, и аналогичными извлечениями из кукурузных рылец.
6. Установить роль в сравнительном анализе влияния водного и 40%-спиртового извлечений из кориандра посевного травы при пероральном введении активности ферментов АОС печени при ее повреждении тетрахлорметаном и этанолом.

### **Научная новизна исследования**

Впервые проведена сравнительная оценка гепатопротекторной активности водного извлечения кориандра посевного (ВИКП) и спиртового извлечения кориандра посевного (СИКП) в условиях экспериментальных моделей поражения печени тетрахлорметаном и этанолом.

Установлено, что ВИКП при пероральном введении обладает выраженным желчегонным действием, достоверно превышающим влияние извлечений из кукурузных рылец в опытах с интактными животными и сопоставимым с действием Карсила в условиях острого токсического поражения печени тетрахлорметаном.

Доказано, что применение ВИКП оказывает гепатопротекторное действие, превосходящее влияние извлечений из кукурузных рылец и Хофитола, и сопоставимое, или по некоторым показателям превышающее действие Карсила при токсическом поражении печени тетрахлорметаном и этанолом, о чем свидетельствует гистоморфологическая картина органа.

Выявлена прямая корреляционная взаимосвязь между степенью гепатопротекции и повышением активности маркеров, характеризующих состояние антиоксидантной системы печени при пероральном введении ВИКП и СИКП.

Установлено, что ВИКП при пероральном введении препятствует развитию окислительного стресса при воздействии различных токсикантов, повреждающих печень, снижает интенсивность перекисных процессов и вызывает стабилизацию мембран гепатоцитов за счет прямого антиоксидантного действия, что является, по-видимому, ведущим фактором в механизме гепатозащитного действия.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные результаты свидетельствуют о выраженной гепатопротекторной и желчегонной активности ВИКП при токсическом поражении печени на разных экспериментальных моделях, что позволяет обосновать перспективность дальнейших более углубленных доклинических испытаний с целью разработки на его основе нового гепатопротекторного средства.

### **Методология и методы исследования**

В проведенном исследовании использовался комплексный подход к оценке эффективности гепатопротекторного действия извлечений из кориандра посевного травы. Ход исследования соответствовал этическим нормам работы с экспериментальными животными (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» и Приказ МЗ РФ от 23.08.2010 №708 Н «Правила лабораторной практики»). Эксперименты выполнялись на крысах обоего пола линии Wistar в соответствии с методическими рекомендациями по проведению доклинических

исследований лекарственных средств (Хабриев Р.У, 2005, Миронов А.Н., 2012), с использованием биологических моделей, современных методов и оборудования.

### **Реализация результатов работы**

Полученные в работе данные используются в учебном процессе на кафедрах фармакологии с курсом клинической фармакологии (акт от 25.09.2017г.), фармакогнозии и ботаники (акт от 19.09.2017г.), органической химии (акт от 02.10.2017г.) ПМФИ-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ. Результаты исследований внедрены в работу научного отдела восстановительной гастроэнтерологии Филиала Железноводская клиника ФГБУ «Пятигорский ГНИИК ФМБА России» (акт от 27.06.2017г.).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Высокая эффективность гепатопротекторного действия ВИКП, связанная с воздействием на основные звенья патогенетических механизмов повреждения гепатоцитов и выявленная способность обеспечивать защиту печени при токсическом поражении тетрахлорметаном и этанолом, позволяет рекомендовать ВИКП (высушенную фракцию) для дальнейших доклинических испытаний с целью создания препаратов на его основе для терапии различных поражений печени.
2. Гепатопротекторные свойства ВИКП коррелируют с желчегонным эффектом, достоверно превышающим влияние извлечений из кукурузных рылец в опытах с интактными животными и сопоставимым с действием Карсила в условиях экспериментальной тетрахлорметановой модели.
3. ВИКП при пероральном введении препятствует развитию окислительного стресса при воздействии тетрахлорметана и этанола, повреждающих печень, снижает интенсивность ПОЛ и вызывает стабилизацию мембран гепатоцитов за счет прямого антиоксидантного действия, что является важным в механизме гепатозащитного действия.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности полученных результатов базируется на большом экспериментальном материале, полученном на стандартизированных по виду,

массе и полу крыс, на использовании современных методов научного эксперимента и его статистической обработке.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на 66<sup>й</sup>, 67<sup>й</sup>, 68<sup>й</sup> научных конференциях «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Пятигорск, 2011–2013 гг.). Работа апробирована на расширенном заседании кафедры биологии и физиологии с курсами биологической химии и микробиологии ПМФИ–филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из которых 9 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

### **Личный вклад автора**

Автором самостоятельно осуществлен поиск и анализ зарубежных и отечественных источников литературы. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором собраны первичные данные, проведен анализ, статистическая обработка и обобщение полученных результатов, сформулированы выводы, оформлена рукопись, подготовлены публикации по основным положениям диссертации.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, 6 глав собственных исследований, обсуждение результатов, выводы, список литературы, включающий 170 отечественных и 91 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 18 таблицами, 39 рисунками и 8 формулами.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**В первой главе** представлены данные исследований отечественных и зарубежных авторов о токсических поражениях печени, их экспериментальном моделировании и основных принципах терапии. В первом разделе главы рассматриваются причины и механизмы развития токсических гепатитов, а также современные подходы к их лечению. Во втором разделе описаны механизмы фармакологического действия растительных полифенолов и их

применение при токсических поражениях печени. В третьем разделе приводятся литературные данные химического состава и биологической активности растения кориандра посевного.

**Во второй главе** описываются материалы и методы исследования. В качестве объектов исследования использовали ВИКП и СИКП, полученные на кафедре органической химии ПМФИ-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ. Спектрофотометрическим методом установлено содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в ВИКП в пределах от 1,55 до 1,67%, и СИКП – 1,42-1,47%.

Исследования выполнены на 468 половозрелых белых крысах линии Wistar обоего пола массой 170-280 г. Животные находились в стандартных условиях вивария при естественном освещении. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Приказом МЗ РФ от 23.08.2010 №708 Н «Правила лабораторной практики» с соблюдением международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, 1986.

Острую токсичность исследуемых извлечений определяли в соответствии с методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ (Хабриев Р.У., 2005). Критерием оценки служила выживаемость животных, наблюдаемых в течение двух недель.

Функциональную активность печени оценивали по продолжительности сна животных (Миронов А.Н., 2012; Хабриев Р.У., 2005), отражающего состояние микросомальной системы, метаболизирующей ксенобиотики, в частности, этаминал натрия (Гацура В.В., 1974; Сернов Л.Н., 2000). Этаминал натрия вводили внутривентриально в дозе 40 мг/кг на 14-й день после курсового введения исследуемых извлечений в разных дозах на фоне токсического поражения печени тетрахлорметаном (Блюгер А.Ф., Карташова О.Я., 1983). Продолжительность сна (по боковому положению) регистрировали в минутах.

Определение эффективных терапевтических доз ВИКП и СИКП было проведено с использованием классической модели поражения печени тетрахлорметаном (Блюгер А.Ф., Карташова О.Я., 1983). Об эффективности

гепатопротекторного действия судили: 1) по изменению биохимических маркеров, характеризующих токсическое поражение печени: холестаза (содержание ОБР), нарушение белкового обмена (содержание ОБ в сыворотке крови), уровень перекисного окисления липидов (содержание ТБК–продуктов в сыворотке крови), жировая дистрофия (содержание ТРГ в печени); 2) по проценту выживших животных; 3) по коэффициенту гепатопротекции. Коэффициент гепатопротекции рассчитывали для каждого биохимического показателя, используя формулу: 
$$H = \left[ 1 - \frac{[O - N]}{[K - N]} \right] \times 100 \%$$
 где, H – коэффициент гепатопротекции; O – значение показателя в опытных группах, N – значение показателя интактной группы, K – значение показателя контрольной группы (Rajesh et al., 2004).

Изучение влияния ВИКП и СИКП на желчевыделительную функцию печени у интактных животных и в условиях токсического поражения печени тетрахлорметаном (Блюгер А.Ф., Карташова О.Я., 1983) проводили в установленных эффективных дозах (150 мг/кг). В качестве препаратов сравнения использовали Карсил и Хофитол. В качестве растительного объекта сравнения применили водное извлечение кукурузных рылец (ВИКР) и 40%-спиртовое извлечение кукурузных рылец (СИКР). Дозы объектов сравнения были рассчитаны исходя из значений суточной дозы для человека, с использованием межвидовых коэффициентов пересчета доз для данного вида животных (Миронов А.Н., 2012, Хабриев Р.У., 2005). Интенсивность желчевыделительной функции печени определяли по количеству желчи, выделившейся в течение 3 часов (Литвинчук М.Д., Новосилец З.И., 1980). В суммарной порции желчи определяли содержание желчных кислот и холестерина (Мирошниченко В.П., 1978).

Изучение гепатопротекторного действия ВИКП и СИКП проводили на фоне токсического поражения печени тетрахлорметаном (Блюгер А.Ф., Карташова О.Я., 1983) и этанолом (Спрыгин В.Г., Кушнерова Н.Ф., 2002). В качестве объектов сравнения использовали Карсил, Хофитол, ВИКР и СИКР, которые вводили перорально в дозах 150 мг/кг. Эффективность гепатозащитного действия оценивали по степени нормализации биохимических

маркеров основных патосиндромов поражения печени и гистоморфологической картине органа. В сыворотке крови определяли маркеры белкового (ОБ) и липидного (ТРГ и ХС) обменов, синдромов цитолиза (АлАт) и холестаза (ОБР и ЩФ). В гомогенате и постъядерной фракции печени (ПФП) определяли содержание гликогена (гликогенсинтетическая функция печени), триглицеридов (степень жировой дистрофии), ТБК–активных продуктов (интенсивность СРО), активность СОД, каталазы и содержание GSH–восстановленного (эффективность системы АОЗ). Биохимические показатели в сыворотке крови определяли на автоматическом биохимическом анализаторе BS–380 «Mindray» с использованием стандартных наборов реагентов «Diasis». Гистоморфологическое исследование печени крыс проводили под руководством Ю.А. Огурцова, кандидата медицинских наук, доцента кафедры морфологии ПМФИ–филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ.

Результаты проведенных опытов обрабатывали методом вариационной статистики. Для определения достоверности количественных различий результатов опытов, проведенных на разных группах животных, вычисляли среднее арифметическое (M) и среднюю ошибку среднего арифметического (m). Данные представлены в виде  $M \pm m$ . Различия между изучаемыми показателями считали статистически значимыми при вероятности  $p < 0,05$ . Для оценки достоверности различий при парном сравнении независимых данных использовались t-тест. Для многопараметровых исследований статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Краскела–Уоллиса с постобработкой тестом Данна, либо с использованием однофакторного дисперсионного анализа и теста Ньюмена–Кейлса при нормальном распределении данных. Результаты наблюдений обобщались с помощью двухфакторного ANOVA метода (Беленький М.П., 1963, Ланг Т.А., Сесик М., 2011; Кочетлов А.Г. и соавт., 2012; Макарова Н.В., 2012). Расчет и статистическая обработка экспериментальных данных реализованы в программе «Microsoft Office Excel 2007» (Макарова Н.В., 2002).

**В третьей главе** представлены результаты изучения «острой» токсичности, определения эффективной терапевтической дозы ВИКП и СИКП, их влияние на детоксицирующую и желчевыделительную функции печени у крыс.

Результаты экспериментов по изучению острой токсичности при пероральном введении ВИКП и СИКП показали, что введение максимально возможной по техническим причинам дозы в 5500 мг/кг не вызвало гибели экспериментальных животных в течение двухнедельного наблюдения, что позволило условно считать  $LD_{50} > 5000$  мг/кг и отнести изучаемые извлечения согласно ГОСТУ 12.1.007-76 и классификации Ходже и Стернера (Березовская И.В., 2003) к V классу «практически нетоксичным веществам».

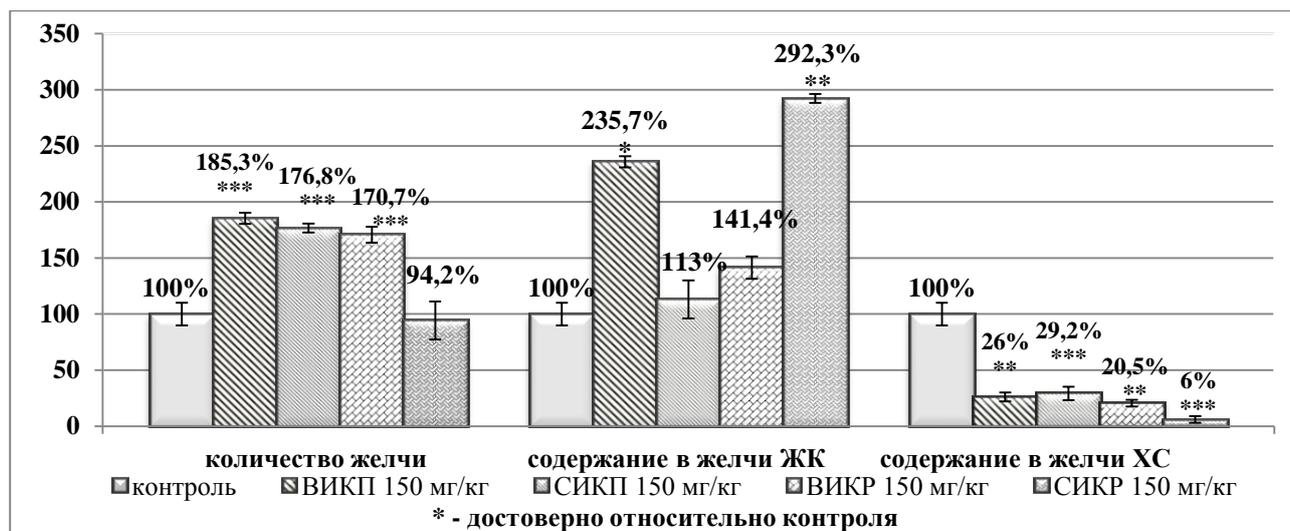
Функциональную активность печени оценивали по продолжительности сна животных (Миронов А.Н., 2012), отражающего состояние микросомальной системы, метаболизирующей ксенобиотики, в частности, этаминал натрия. Полученные данные свидетельствуют о сохранении активности микросомальных ферментов печени на фоне токсического поражения  $CCl_4$  при введении ВИКП и СИКП, что выразилось в сокращении продолжительности сна крыс в максимальной степени при дозе 150 мг/кг, статистически достоверно относительно контроля (на 55,7% и на 53,3% соответственно).

Установлено, что при лечебно-профилактическом введении ВИКП и СИКП в дозах 30, 150, 250 и 500 мг/кг на фоне поражения печени тетрахлорметаном, учитывая изменения биохимических показателей, расчетные значения коэффициента гепатопротекции и процент выживших животных, эффективной терапевтической дозой ВИКП и СИКП является доза 150 мг/кг.

Оценку желчевыделительной функции печени проводили на 14-е сутки после курсового введения ВИКП и СИКП в дозах 150 мг/кг интактным животным, а также в условиях токсического поражения печени тетрахлорметаном.

Установлено, что ВИКП и СИКП оказывают выраженное желчегонное действие у интактных животных, что подтверждается увеличением общего количества желчи (на 85,3% и 76,8%), выделившейся за 3 часа, снижением холестерина (на 74% и 70,8%) и увеличением концентрации желчных кислот

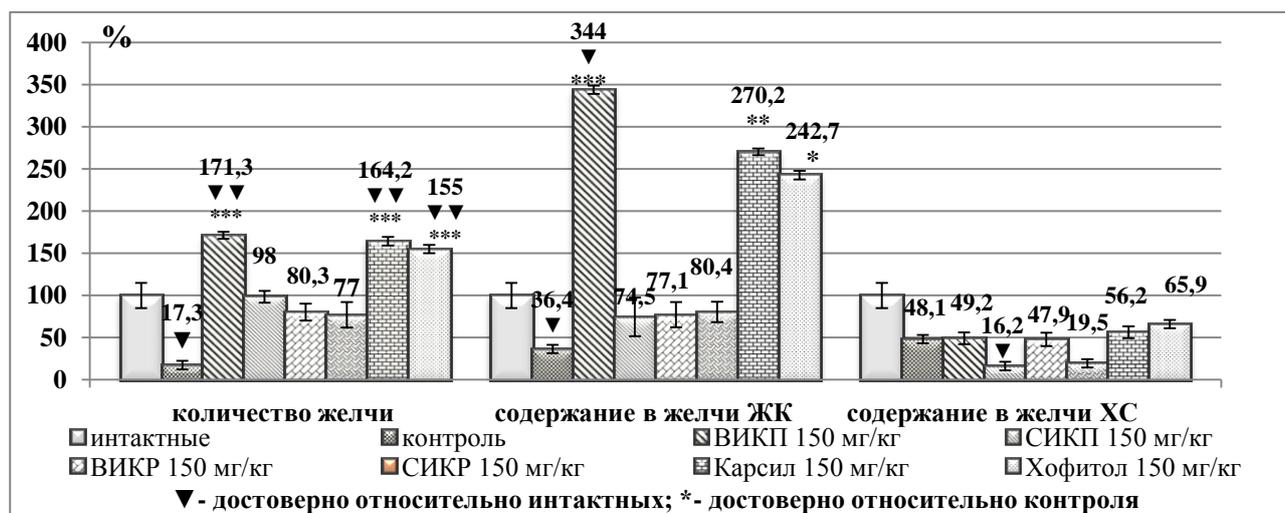
(на 135,7% и 13%) в желчи, в связи с чем увеличился холято-холестериновый коэффициент (на 77,1% и 32,8%) соответственно (рисунок 1).



**Рисунок 1** - Влияние извлечений из кориандра посевного травы на желчевыделение у интактных животных

(\*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$ ; \*\*\*- $p < 0,001$ ) - однофакторный дисперсионный анализ (t-критерий Краскелла-Уоллиса с постобработкой тестом Данна);

При моделировании гепатита введение ВИКП и СИКП также нормализовало желчевыделительную функцию печени (рисунок 2). При этом достоверно увеличился, в сравнении с контролем, объем выделившейся за 3 часа желчи (в 8,9 и 4,7 раза), на фоне снижения холестерина увеличилась концентрация желчных кислот в желчи (в 8,5 и 1,2 раза). Следует отметить, что показатели группы, получавшей СИКП, по выраженности фармакологического эффекта, уступают таковым ВИКП.



**Рисунок 2** - Влияние извлечений из кориандра посевного травы на желчевыделение у животных с токсическим поражением печени тетрахлометаном

(▼- $p < 0,05$ ; ▼▼- $p < 0,01$ ; ▼▼▼- $p < 0,001$ ) - однофакторный дисперсионный анализ (t-критерий Краскелла-Уоллиса с постобработкой тестом Данна);

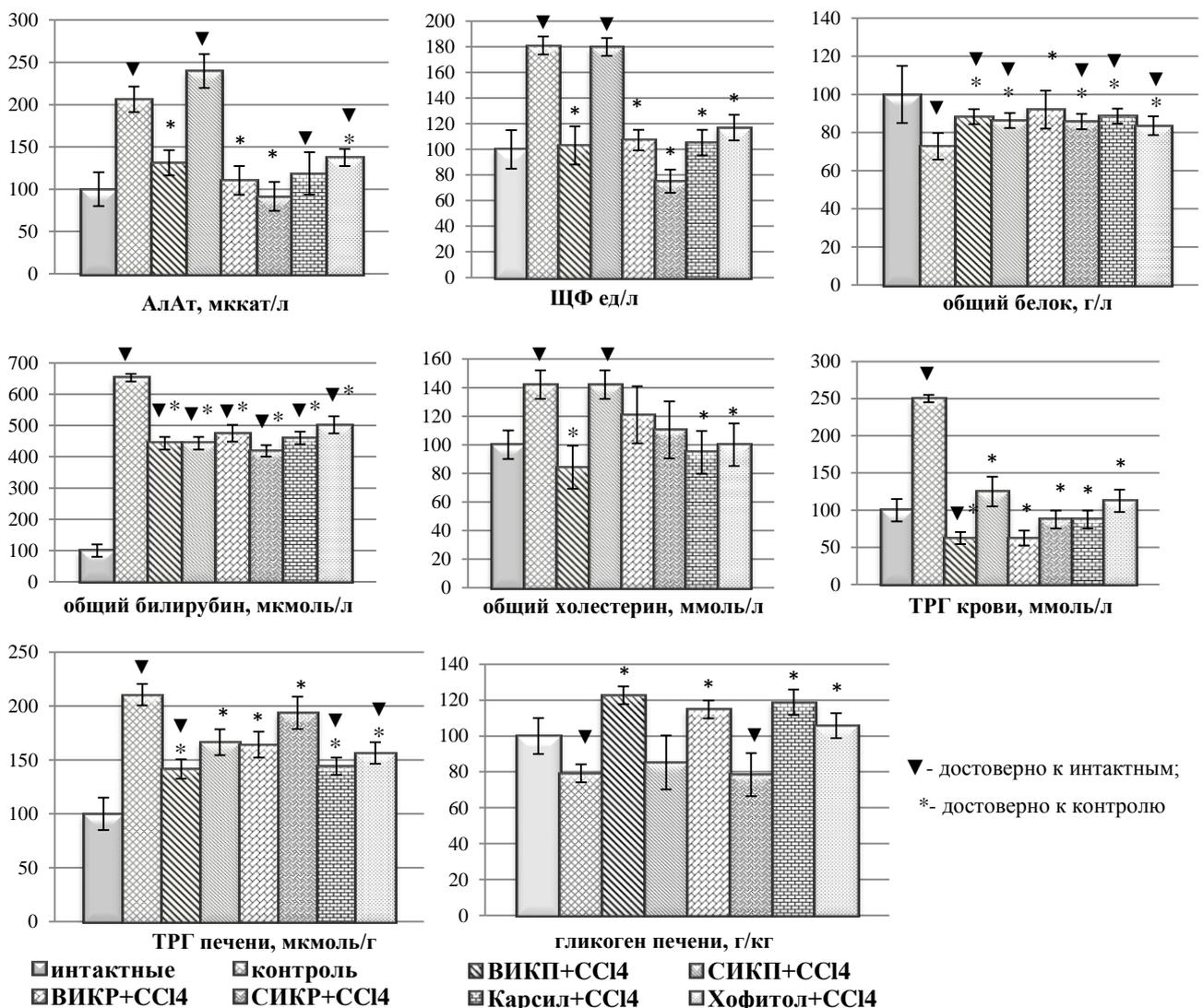
(\*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$ ; \*\*\*- $p < 0,001$ ) - однофакторный дисперсионный анализ (t-критерий Краскелла-Уоллиса с постобработкой тестом Данна).

**В четвертой главе** приведено описание влияния ВИКП и СИКП на функциональные, метаболические и гистоморфологические показатели при остром поражении печени тетрахлорметаном.

Проведенные фармакологические исследования показали (рисунок 3), что у пораженных тетрахлорметаном животных наблюдается развитие выраженного цитолиза (повышение активности АлАт на 106,3%), холестаза (повышение активности ЩФ на 81%), гипербилирубинемии (увеличение ОБР в 5,5 раз), которая, по-видимому, связана как с воспалением желчевыводящих путей и нарушением оттока желчи, так и с нарушением целостности мембран гепатоцитов, что приводит к повышенному выходу билирубина в кровь. Нарушается липидный обмен, что характеризуется повышением холестерина в сыворотке крови на 42% ( $p < 0,05$ ) и ТРГ на 150% ( $p < 0,05$ ) с одновременным увеличением количества ТРГ в печени на 110,5% ( $p < 0,001$ ), что, вероятно, является одной из причин жирового перерождения печени. Нарушается белковосинтетическая функция печени, что выражается в уменьшении содержания сывороточного общего белка на 27,2% ( $p < 0,01$ ), а также углеводный обмен, что подтверждается снижением содержания гликогена в печени на 20,9% ( $p < 0,05$ ). Это в определенной степени свидетельствует об усилении анаэробных путей обеспечения клетки энергией и может косвенно указывать на нарушение процессов митохондриального окисления и фосфорилирования. Кроме того, на гистологических срезах печени отмечены выраженные патологические изменения: жировая дистрофия, лимфоцитарная инфильтрация, нарушение структуризации печеночных балок и некроз гепатоцитов.

Анализ полученных результатов показал, что по большинству биохимических маркеров применение ВИКП оказало более выраженное гепатозащитное действие, чем СИКП (рисунок 3). В частности, введение ВИКП способствовало значительному снижению сывороточной активности АлАт на 36,4% ( $p < 0,01$ ) и ЩФ на 43,1% ( $p < 0,05$ ), в то время как введение СИКП практически не изменяло эти показатели в сравнении с контролем. Применение ВИКП, в большей мере, способствовало восстановлению белковосинтетической

функции печени: содержание ОБ в сыворотке крови животных повысилось на 21,3% ( $p < 0,05$ ), чем при введении СИКП (повышение ОБ на 18,5%,  $p < 0,05$ ), по отношению к контролю. Такая же закономерность отмечалась и в отношении ХС (-40,7% у ВИКП против нулевого эффекта у СИКП), ТРГ сыворотки крови (-75% и -50%) и печени (-32,8% и -20,9%), а также гликогена печени (+55% и +7,7%) соответственно. Наблюдаемый фармакологический эффект ВИКП сравним с показателями групп, получавших ВИКР и Карсил. Применение ВИКП, практически в равной мере с действием Карсила, способствовало нормализации белковосинтетической функции печени, показателей липидного и углеводного обменов, достоверно в большей степени препятствовало развитию триглицеридемии, а также Карсил статистически достоверно не снижал активность АлАт в сыворотке крови (рисунок 3).



**Рисунок 3** - Изменение биохимических показателей в сыворотке крови и печени при введении исследуемых веществ в дозе 150 мг/кг животным с токсическим поражением печени тетрахлорметаном

На гистологической картине печени у животных, получавших ВИКП отмечается достоверно меньший рост некротизированных гепатоцитов ( $32\pm 4,0\%$ ), в сравнении с извлечениями из кукурузных рылец ( $51\pm 6,0\%$  и  $88\pm 5,0\%$ ), Карсилом ( $48\pm 5,0\%$ ) и Хофитолом ( $59\pm 6,0\%$ ).

Таким образом, динамика гистоморфологических изменений в печени в общем коррелирует с направленностью сдвигов биохимических показателей в крови и ткани печени, что свидетельствует о выраженной направленности к восстановлению метаболических процессов в пораженном органе при приеме ВИКП.

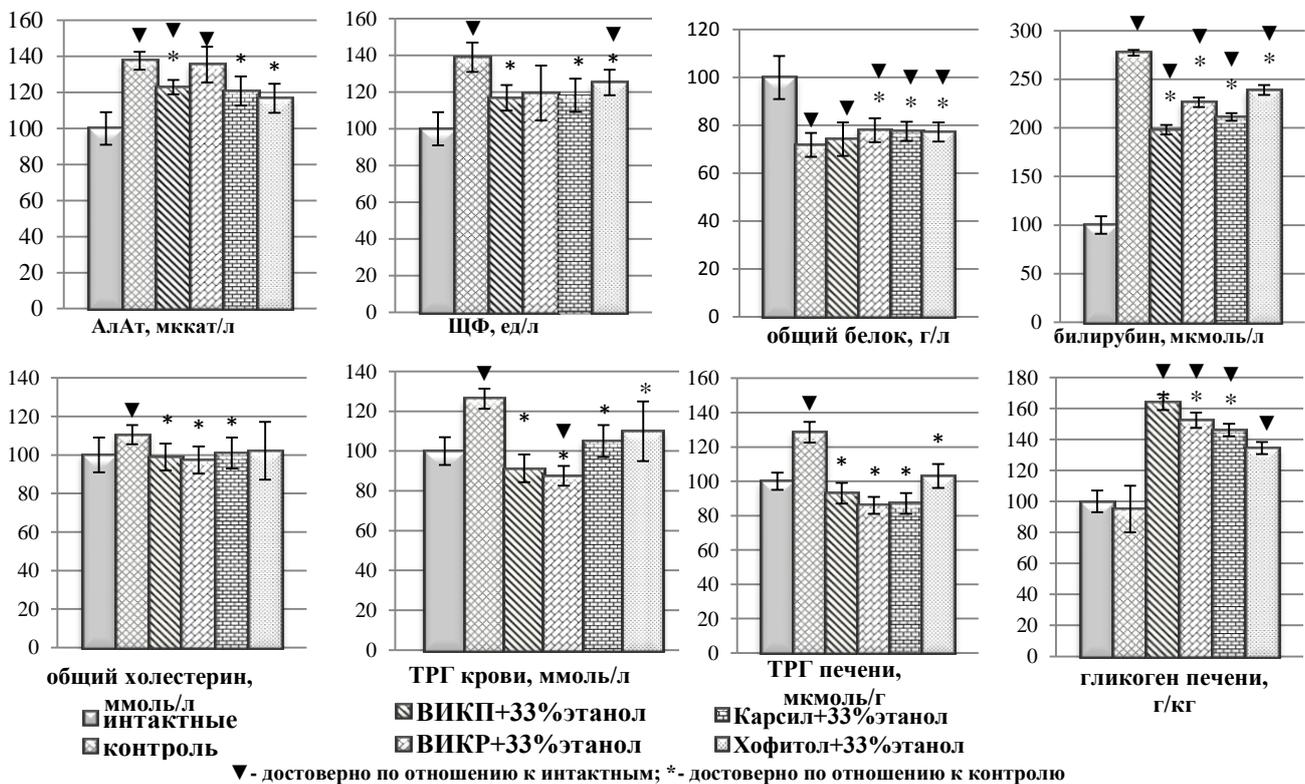
**В пятой главе** описано влияние ВИКП на метаболические и гистоморфологические показатели при остром поражении печени этанолом.

Острое алкогольное отравление также вызывает развитие поражения печени с теми же характерными сдвигами биохимических показателей, что наблюдалось при введении тетрахлорметана (рисунок 4). При этом также отмечается развитие гепатоцитолита (повышение АлАт на  $37,5\%$ ), холестаза (повышение ЩФ на  $39\%$ ; ОБР на  $177,3\%$ ), нарушение липидного обмена (повышение ХС в крови на  $10,5\%$ ; ТРГ в сыворотке крови и печени на  $26,3\%$  и  $28,6\%$  соответственно), снижение гликогенсинтетической и белковосинтетической (снижение уровня гликогена в печени на  $5\%$  и ОБ в сыворотке крови на  $28,2\%$  соответственно) функций печени. Из полученных результатов следует, что интоксикация этанолом приводит к нарушению метаболических процессов в органе. На гистологической картине отмечается острый воспалительный процесс, увеличение размеров гепатоцитов с просветлением цитоплазмы, кариопикнозом и кариорексисом, нарушение кровообращения в органе (у отдельных животных контрольной группы выявлены обширные диапедезные кровоизлияния).

Применение исследуемых веществ выявило идентичную направленность их воздействия на процессы нормализации изученных биохимических параметров (рисунок 4). Так, введение ВИКП крысам с токсическим алкогольным гепатитом в дозе  $150$  мг/кг, в равной мере с действием ВИКР и Карсила, показало достоверное, в сравнении с контролем, снижение в

сыворотке крови активности АлАт (на 10,6%), ЩФ (на 16%), уровня ОБР (на 28,6%), ХС (на 10,5%), ТРГ в сыворотке крови (на 27,7%) и печени (на 27,6%). Исследуемое извлечение значительно активировало гликогенсинтетическую функцию печени (рисунок 4).

На гистологической картине печени при введении Хофитола и ВИКР просматриваются клетки в состоянии гидропической дистрофии, выражена дискомплексация печеночных балок, наблюдаются диапедезные кровоизлияния и гиперемия сосудов, тогда как при введении ВИКП и Карсила балочная структура печеночных долек в целом сохранена. Отмечается меньшее количество гепатоцитов в состоянии гидропической дистрофии. Гиперемии сосудов и диапедезных периваскулярных кровоизлияний не наблюдается. Следует подчеркнуть, что ВИКП обладает выраженным гепатопротекторным действием при поражении печени этанолом. Восстановление функционального состояния печени происходит более эффективно по сравнению с введением ВИКР и Хофитола. По механизму фармакологического действия ВИКП сопоставимо с Карсилом, что подтверждается полученными данными биохимических и морфологических исследований.



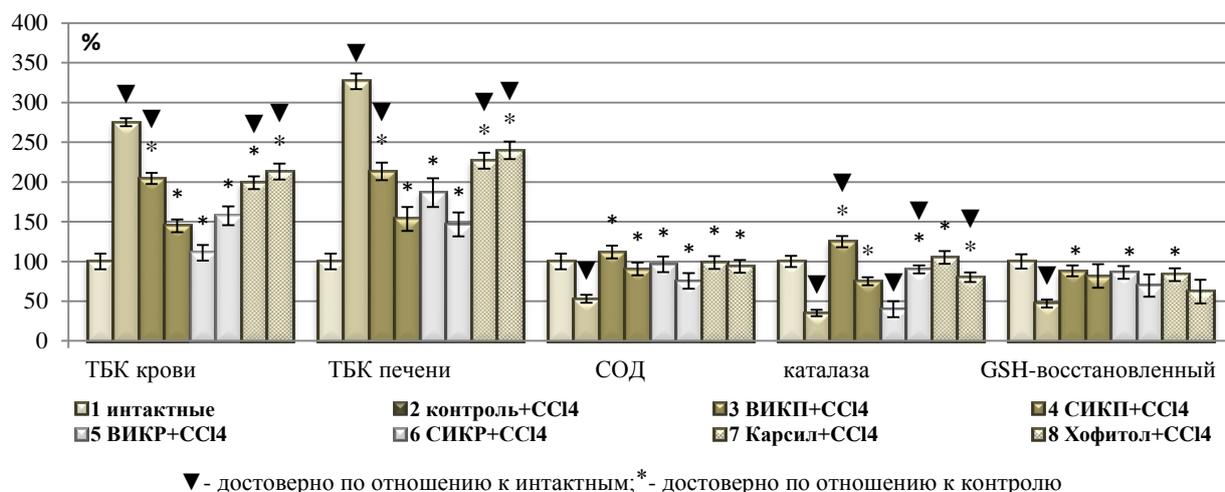
**Рисунок 4-**Изменение биохимических показателей в сыворотке крови и печени при введении исследуемых веществ в дозе 150 мг/кг животным с токсическим поражением печени этанолом

**В главе 6** охарактеризована роль свободно-радикального окисления в механизме действия извлечений из кориандра посевного при токсических поражениях печени.

Установлено, что при токсическом поражении печени крыс тетрахлорметаном и этанолом развивался выраженный дисбаланс в системе про-/антиоксиданты, который характеризовался повышением содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке крови (на 175,1% и на 90,8% соответственно) и печени (на 226,3% и на 60% соответственно). Одновременно регистрировалось снижение активности важнейших антиоксидантных ферментов в печени: СОД (на 47% и на 39%), каталазы (на 65% и на 60%) и содержания GSH-восстановленного (на 53% и на 25%) соответственно (рисунки 5 и 6). Обращает на себя внимание, более выраженное свободно-радикальное и перекисное повреждение клеток, с одновременным снижением уровня активности печеночной АОС при воздействии тетрахлорметаном (рисунок 5), чем этанолом (рисунок 6).

Курсовое введение ВИКП способствовало снижению интенсивности свободно-радикального окисления и повышению активности эндогенной АОС как при тетрахлорметановом, так и при алкогольном поражении печени. При этом наблюдалось достоверное, относительно контроля, уменьшение содержания ТБК-продуктов в сыворотке крови (-25,6% и -36,4% соответственно) и печени (-34,7% и -41,7% соответственно), повышалась активность СОД (+111% и +68,2% соответственно), каталазы (+257% и +125% соответственно) и увеличивался уровень GSH-восстановленного (+87,7% и +51,3% соответственно) в печени (рисунки 5 и 6). Применение Карсила на фоне тетрахлорметанового и алкогольного поражения печени также вызвало достоверное, по отношению к контролю и сопоставимое с ВИКП, снижение содержания ТБК-продуктов в сыворотке крови (-27,2% и -33,4% соответственно) и печени (-30,6% и -33,3% соответственно). В тоже время показатели эффективности антиоксидантной защиты гепатоцитов: СОД (+86% и +66,2% соответственно), каталаза (+200% и +100% соответственно) и GSH-восстановленный (+77,2% и +40,6% соответственно), хотя и достоверно

повысились, но в сравнении с ВИКП, и в одном и в другом случае, были менее выражены (рисунки 5 и 6).



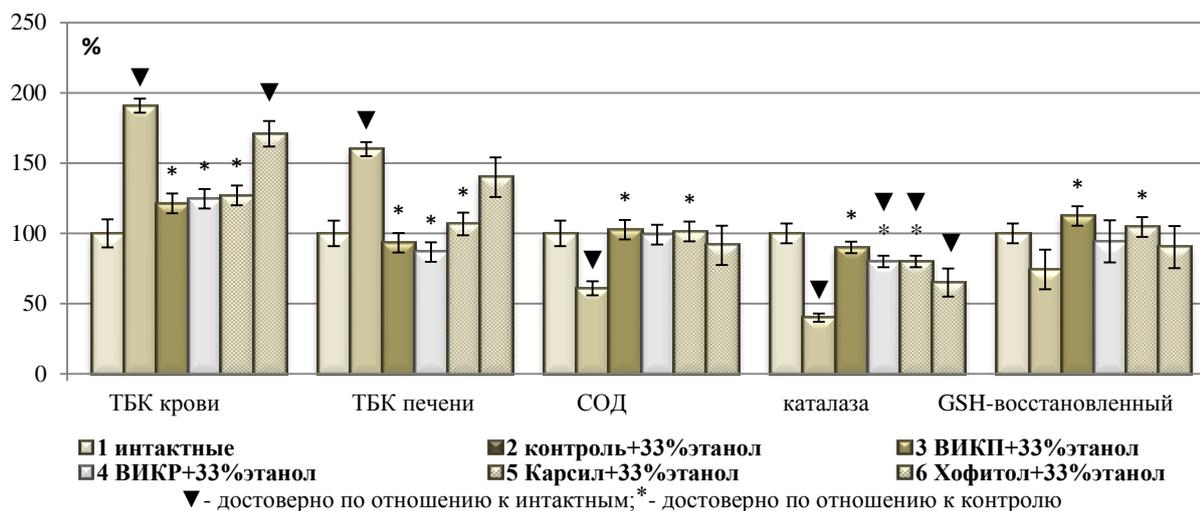
**Рисунок 5** – Влияние курсового введения исследуемых веществ в дозе 150 мг/кг на функциональное состояние печени при поражении тетрахлолорметаном

**Таблица 1**

Влияние ВИКП и СИКП на корреляционные взаимосвязи показателей сыворотки крови и печени животных при поражении тетрахлолорметаном

Анализируемые пары показателей	Контроль (СС <sub>4</sub> гепатит)	ВИКП (150 мг/кг) ±СС <sub>4</sub>	СИКП (150 мг/кг) ±СС <sub>4</sub>	Карсил (150мг/кг) ±СС <sub>4</sub>	Хофитол (150мг/кг) ±СС <sub>4</sub>
ОБР / ТБК печени	+0,500	<b>+0,828*</b>	<b>+0,900*</b>	-0,028	+0,600
ХС / Гликоген	+0,257	<b>-0,886**</b>	+0,771	-0,300	-0,600
ХС / GSH-	+0,257	+0,143	<b>+0,943**</b>	+0,300	-0,028
ТРГ крови /GSH-	+0,600	+0,314	<b>+0,943**</b>	-0,600	-0,400
ТБК печени /GSH-	-1,00	-0,314	+0,700	-0,429	<b>+0,828*</b>
Гликоген / GSH-	<b>-0,829*</b>	-0,200	<b>+0,829*</b>	+0,086	-0,371
СОД / GSH-	+0,257	-0,143	-0,300	<b>+0,829*</b>	+0,257
СОД / Гликоген	+0,028	<b>+0,886*</b>	-0,400	-0,029	<b>-0,943**</b>

Таким образом, прием ВИКП на уровне Карсила, препятствует развитию окислительного стресса при обеих патологиях, снижает интенсивность ПОЛ и вызывает стабилизацию мембран гепатоцитов, вероятно, за счет прямого антиоксидантного действия, что подтверждается снижением ТБК-продуктов в сыворотке крови и печени, и повышением СОД, каталазы и GSH-восстановленного в печени, что является важным показателем в механизме гепатопротекторного действия.



**Рисунок 6** – Влияние курсового введения исследуемых веществ в дозе 150 мг/кг на функциональное состояние печени при поражении этанолом

**Таблица 2**

*Влияние ВИКП на корреляционные взаимосвязи показателей сыворотки крови и печени животных при поражении этанолом*

Анализируемые пары показателей	Контроль (алкогольный гепатит)	ВИКП (150мг/кг) +33%этанол	Карсил (150мг/кг) +33%этанол	Хофитол (150мг/кг) +33%этанол
АлАт / ТБК крови	<b>-0,828*</b>	-0,084	-0,029	-0,486
АлАт / ХС крови	+0,257	-0,261	-0,314	<b>-0,928**</b>
АлАт / Гликоген	-0,800	<b>+0,829*</b>	-0,371	+0,600
ЩФ / ХС крови	-0,543	<b>-0,899**</b>	+0,371	+0,319
ОБ / ТБК крови	-0,250	<b>+0,862**</b>	-0,314	+0,485
ОБР / Гликоген	-0,400	<b>+0,886*</b>	-0,600	-0,319
ОБР / ТРГ крови	+0,900	-0,267	<b>+0,812*</b>	<b>+0,986***</b>
ОБР / GSH	-0,400	+0,600	<b>+0,828*</b>	-0,579
Гликоген / СОД	-0,200	-0,300	<b>-0,886*</b>	-0,314
Гликоген / ТБК крови	+0,400	+0,428	+0,371	<b>-0,943**</b>

Для обоснования значения восстановления про-антиоксидантного равновесия в механизмах гепатопротекторного действия, были рассчитаны коэффициенты корреляции между изменениями биохимических показателей сыворотки крови и печени в опытных группах с токсическим поражением тетрахлорметаном (таблица 1) и этанолом (таблица 2). Рассчитанные коэффициенты оказались практически равными 1. Тесная корреляционная взаимосвязь между эффективностью защитного действия и нормализацией антиоксидантных маркеров печени показывает, что в проявлении гепатопротекторного действия полифенольных соединений кориандра ведущее

значение имеет не только ингибирование процессов ПОЛ, но и поддержание активности ферментов АОС.

**Заключение** содержит обобщенную информацию по проведенной исследовательской работе. Полифенольный состав надземной части травы кориандра посевного предполагает наличие широкого спектра биологической активности, в связи с чем проведенные исследования направлены на выявление желчегонных и гепатопротекторных свойств извлечений. По результатам экспериментальной работы установлено желчегонное действие ВИКП в дозе 150 мг/кг, выраженное увеличением объема выделившейся за 3 часа желчи, повышением концентрации желчных кислот и снижением холестерина в желчи. Эффективность желчегонного действия ВИКП, обусловленная, очевидно, наличием полифенольных соединений в извлечении, достоверно превышает влияние извлечений из кукурузных рылец в опытах с интактными животными, и сопоставимо с действием Карсила и Хофитола в условиях токсического поражения печени тетрахлорметаном. Выявлены гепатопротекторные и антиоксидантные свойства ВИКП и СИКП в дозах 150 мг/кг на разных экспериментальных моделях поражения печени. На фоне тетрахлорметанового гепатита, применение ВИКП, практически в равной мере с действием Карсила, способствовало нормализации белковосинтетической функции печени, показателей липидного и углеводного обменов и достоверно в большей степени препятствовало развитию цитолиза и триглицеридемии. В условиях алкогольного гепатита, введение ВИКП, на уровне Карсила, предупреждало развитие цитолиза, холестаза, триглицеридемии, но в большей степени активировало гликогенсинтетическую функцию печени. Полученные данные проведенных исследований свидетельствуют о том, что курсовое применение ВИКП отличается метаболическими механизмами действия при токсических поражениях различной этиологии. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем доклиническом исследовании ВИКП, содержащего полифенольные соединения, для разработки нового гепатопротекторного средства на его основе с антиоксидантной направленностью действия.

## ВЫВОДЫ

1. Установлена эффективная терапевтическая доза ВИКП и СИКП (150 мг/кг) при пероральном введении на классической модели поражения печени тетрахлорметаном по изменению биохимических показателей, расчетным значениям коэффициента гепатопротекции и проценту выживших животных.
2. Гепатопротекторные свойства ВИКП в дозе 150 мг/кг коррелируют с желчегонным эффектом, достоверно превышающим влияние извлечений из кукурузных рылец в опытах с интактными животными и сопоставимым с действием Карсила и Хофитола в условиях экспериментальной тетрахлорметановой модели.
3. ВИКП при пероральном введении в дозе 150 мг/кг на модели поражения печени тетрахлорметаном с учетом изменения биохимических маркеров, обладает гепатозащитным действием, превышающим влияние извлечений из кукурузных рылец и Хофитола, и сопоставимым с препаратом сравнения Карсилом. На гистологической картине печени у животных, получавших ВИКП отмечается достоверно меньший рост некротизированных гепатоцитов ( $32\pm 4,0\%$ ), в сравнении с извлечениями из кукурузных рылец ( $51\pm 6,0\%$  и  $88\pm 5,0\%$ ), Карсилом ( $48\pm 5,0\%$ ) и Хофитолом ( $59\pm 6,0\%$ ).
4. ВИКП при пероральном введении в дозе 150 мг/кг на модели поражения печени этанолом способствует нормализации сывороточных и печеночных биохимических маркеров, обладает гепатозащитным действием, сопоставимым или, по некоторым показателям, превышающим влияние Карсила, механизм действия которого обусловлен антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами, что подтверждается степенью и характером морфологических изменений в срезах печени.
5. Введение ВИКП препятствует развитию окислительного стресса при воздействии тетрахлорметана и этанола, повреждающих печень, снижает интенсивность ПОЛ и вызывает стабилизацию мембран гепатоцитов за счет прямого антиоксидантного действия, что является важным в механизме гепатозащитного действия.

6. Эффективность гепатопротекторного действия ВИКП, сопоставима или превышает эффективность эталонных гепатопротекторов Карсила и Хофитола, что позволяет рекомендовать ВИКП для последующих более углубленных доклинических исследований, необходимых для создания нового лекарственного средства, сочетающего гепатопротекторные и желчегонные свойства.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Полученные данные свидетельствуют о выраженной гепатопротекторной и желчегонной активности ВИКП, установленной на разных экспериментальных моделях, что делает перспективным возможность использования ВИКП (высушенной фракции) для разработки препаратов в целях лечения и профилактики гепатопатий.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, 9 из них - в российских рецензируемых научных журналах, включенных в перечень изданий, рекомендованных ВАК для публикаций результатов диссертаций.

*Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ*

1. Аракелян, В.В. Экспериментальное обоснование гепатотропного действия извлечений кориандра посевного / В.В. Аракелян., Ю.К. Василенко // Известия Самарского центра РАН. – 2012. – Т. 14. – № 5 (3). – С. 696-699.
2. Аракелян, В.В. Влияние водных извлечений из травы кориандра посевного на структурно-функциональные изменения в печени у крыс с гепатозом / В.В. Аракелян., Ю.К. Василенко // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10 (6). С. 1302-1306.
3. Аракелян, В.В. Желчегонная и гепатопротекторная активность водных и спиртовых извлечений из травы кориандра посевного при гепатозе / В.В. Аракелян., Ю.К. Василенко., В.С. Давыдов // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 1; URL: [www.science-education.ru/107-8450](http://www.science-education.ru/107-8450)
4. Аракелян, В.В. Структурно-метаболические изменения при алкогольной гепатопатии при приеме извлечений из травы кориандра посевного / В.В. Аракелян., Ю.К. Василенко., А.Ю. Огурцов // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 5 (6). С. 1262-1265.
5. Аракелян, В.В. Экспериментальное обоснование гепатопротекторного средства из травы кориандра / В.В. Аракелян., Ю.К. Василенко // Известия Самарского центра РАН. – 2014. – Т. 16. – № 5 (2). С. 977–979.
6. Аракелян, В.В. Влияние извлечений из травы кориандра посевного на метаболические и гистоморфологические показатели при четыреххлористой и алкогольной гепатопатии / В.В. Аракелян // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4; URL: [www.science-education.ru/118-13974](http://www.science-education.ru/118-13974)
7. Аракелян, В.В. Гепатопротекторное действие извлечений из травы кориандра посевного при четыреххлористой и алкогольной гепатопатии / В.В. Аракелян., Ю.К. Василенко., С.Ю.

Маширова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 1-1; URL: [www.science-education.ru/121-19720](http://www.science-education.ru/121-19720)

8. Давыдова, В.В. Биохимическая оценка гепатотоксичности при приеме извлечений из кориандра посевного / В.В. Давыдова., Ю.К. Василенко., С.Ю. Маширова // Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19. – № 5. – С. 130-137.

9. Гепатопротекторные и антиоксидантные свойства извлечений из травы кориандра посевного в условиях токсического поражения печени тетрахлорметаном и этанолом / В.В. Давыдова [и др.] // Современная наука и инновации. – 2017. – № 3 (19). – С. 202-211.

*Статьи в журналах и сборниках материалов конференций:*

1. Аракелян, В.В. Исследование гепатопротекторной активности извлечений из травы кориандра посевного / В.В. Аракелян., Ю.К. Василенко., А.Ю. Терехов // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2011. – Вып. 66. – С. 490-491.

2. Аракелян, В.В. Желчегонные свойства извлечений из травы кориандра посевного у здоровых животных и животных с гепатозом / В.В. Аракелян., Ю.К. Василенко // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2012. – Вып. 67. – С. 297-299.

3. Аракелян, В.В. Структурно-функциональные изменения печени у крыс с гепатозом при введении извлечений из травы кориандра посевного / В.В. Аракелян., Ю.К. Василенко., Ю.А. Огурцов // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2013. – Вып. 68. – С. 296-300.

## СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

CCl<sub>4</sub> – тетрахлорметан

GSH – глутатион восстановленный

ТГ – триглицериды

ХС – холестерин

АКМ – активные кислородные метаболиты

ЩФ – щелочная фосфатаза

АлАт – аланинаминотрансфераза

АОЗ – антиоксидантная защита

АОС – антиоксидантная система

ВИКП – водное извлечение кориандра посевного

ВИКР – водное извлечение кукурузных рылец

ЛС – лекарственные средства

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ОБ – общий белок

ОБР – общий билирубин

ПБ – прямой билирубин

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЯФ – постъядерная фракция

ПФП – постъядерная фракция печени

СОД – супероксиддисмутаза

СИКП – спиртовое извлечение кориандра посевного

СИКР – спиртовое извлечение кукурузных рылец

СРО – свободнорадикальное окисление

**Давыдова Виктория Владимировна**

**ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ИЗВЛЕЧЕНИЙ ИЗ КОРИАНДРА  
ПОСЕВНОГО ТРАВЫ (CORIANDRUM SATIVUM L. HERBA) ПРИ  
ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Подписано в печать «\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.  
Формат 60x84/16. Бумага кн.- журнальная  
Печать ротاپринтная. Усл. печ.л. \_\_\_\_.  
Тираж 100 экз. Заказ \_\_\_\_\_  
Пятигорский медико-фармацевтический  
Институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ  
375532, г. Пятигорск, проспект Калинина, 11.