

На правах рукописи

ЕФИМОВА АЛЕНА ОЛЕГОВНА

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭКСТРАКТА *HIRUDO MEDICINALIS*, МАЗИ И
ГЕЛЯ НА ЕГО ОСНОВЕ ПРИ НАКОЖНОМ ПРИМЕНЕНИИ**

(экспериментальное исследование)

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Волгоград, 2020

Работа выполнена в лаборатории фармакологии Акционерного общества «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ»

Научный руководитель:

Митрохин Николай Михайлович - доктор биологических наук, академик РАН, профессор

Официальные оппоненты:

Кучерявенко Аида Фатиховна - доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России

Резников Константин Михайлович - доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко»

Ведущая организация:

ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «__» _____ 2020 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.02 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу 400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1 и на сайте www.volgmed.ru

Автореферат разослан «____» _____ 2020 г.

Ученый секретарь

**Диссертационного совета,
доктор биологических наук**

Бугаева Любовь Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

В системе здравоохранения большое внимание уделяют созданию новых высокоэффективных и безопасных лекарственных средств (Shakouri A. et al., 2018; Meng Z., Huang R., 2018), в том числе сердечно-сосудистой и противовоспалительной направленности. Регулярно, при терапии препаратами, представленными как продуктами химического синтеза, так и животного или растительного происхождения, отмечаются побочные эффекты (Quan L. et al., 2016), что в некоторых случаях ограничивает возможность их клинического применения.

Актуальна проблема поиска новых потенциальных лекарственных средств (Heier C. R. et al., 2013, Пахомова Е.Е. и др., 2015, Эмедова Т.А. и др., 2015, Nishino H. et al., 2016). Отправной точкой исследований является многовековая история применения классических методов лечения - фитотерапия, апитерапия, гирудотерапия и др., которые наряду с высокой терапевтической активностью демонстрируют минимальные побочные эффекты (Слободская Н.С., 2016). Большинство известных антикоагулянтов обладают побочными эффектами, настроенным отношением к их применению в терапии различных заболеваний (Латфуллин И.А., Подольская А.А., 2006; Марцевич С.Ю., Лукина Ю.В., 2011; Capodanno D. et al., 2016; Sherman R. A., Cooper E. L., 2018).

Анализ многовековой истории успешного применения медицинских пиявок для лечения ряда заболеваний свидетельствует о высокой антитромботической эффективности компонентов секрета слюнных желез пиявок (Frolov A. K., Litvinenko R. A., 2015). Особого внимания заслуживают положительные результаты гирудотерапии при сердечно-сосудистых заболеваниях, в процессе лечения которых проявляются противотромботическое, тромболитическое и противовоспалительное действия комплекса биологически активных веществ (БАВ) пиявки медицинской *Hirudo medicinalis* (Никонов Г.И., 1998; Баскова И.П., 2004; Neun V. W., Dobrovolskaia M. A., 2018).

Пиявка *Hirudo medicinalis* является источником уникальных соединений, синтезируемых только этим видом животных. Прежде всего, это гирудин - высокоспецифичный ингибитор тромбина (Баскова И.П., Исханян Г.С., 2004); простагландины по спектру фармакологического действия подобные простациклину ($PGF_{1\alpha}$), которые обеспечивают, в первую очередь, блокаду тромбоцитарно-сосудистого звена внутреннего механизма свертывания крови (Nesemann H., 1999; Siddall, M.E., 2011; Lui C., Barkley Jr T. W., 2015); дестабилазный комплекс – пример природной липосомы полифункционального (прежде всего, противотромботического и тромболитического) действия (O'Donnell M.J., 1997; Trontelj P., 2004; Frolov A. K., Litvinenko R. A., 2015). Понимание механизмов действия секрета слюнных желез (ССЖ) медицинских пиявок позволит целенаправленно использовать этот природный ингибитор тромбообразования в качестве фармакологического средства.

До настоящего времени в качестве лекарственных форм препаратов на основе медицинской пиявки используют жидкие (в виде растворов для внутривенных инъекций) или твердые лекарственные формы (в виде таблеток или капсул).

Степень разработанности темы

Пиявка медицинская *Hirudo medicinalis* имеет многовековой опыт успешного применения в классической и современной медицине (Петров И.Р. и соавт., 1936; Никонов Г.И. и соавт., 1995; Рассадина Е.В., 2006; Linnaeus C., 1758). Более чем полуторавековая история изучения механизмов действия биологически активных соединений, продуцируемых медицинскими пиявками, создает предпосылки для расширения области применения гирудотерапии и создания ряда лекарственных препаратов на их основе (Никонов Г.И. и соавт., 1998, 2015; Baskova I.P. et al., 2008; Elliott, J.M., 2011). Экстракт пиявок является источником уникальных компонентов, действие которых направлено на профилактику и лечение тромбозов, атеросклероза, гипертензии, воспалительных процессов, сердечно-сосудистых и кожных заболеваний и т.д. (Волк Р.Б., 1950; Геращенко Л., 2008; Григорьев Г.Н., 1998; Davies R.W. McLoughlin N.J., 1996). Разработанные и внедренные в практику лекарственные формы: гирулюкс и пиявит (желатиновые капсулы для перорального применения) являются препаратами «первого поколения», поскольку входящий в их состав комплекс биологически активных веществ, продуцируемых медицинскими пиявками обеспечивает: профилактику и лечение тромбозов, атеросклероза, гипертензии, воспалительных процессов, сердечно-сосудистых и кожных заболеваний и т.д. В тоже время, при ряде патологий, связанных с нарушениями в системе свертывания крови, а также для профилактики послеоперационных тромбозов возникает необходимость направленного антикоагулянтного действия, без воздействия на системы фибринолиза, комплемента и внешний механизм свертывания крови (Никонов Г.И. и соавт., 2001; Баскова И.П., Исаханян Г.С., 2004; Лебедева А.О. и соавт., 2014). В исследовании В. Risberg, Н.И. Peterson (1976), изучено влияние «гирудоид» крема на процесс фибринолиза на моделях кожи крыс и человека, подтверждено положительное влияние крема в лечении тромбофлебита.

Предметом настоящего исследования явилось изучение фармакологических свойств и общетоксического действия субстанции и мягких лекарственных форм на основе экстракта пиявки медицинской.

Цель исследования

Экспериментальное обоснование применения мази и геля с экстрактом медицинской пиявки для терапии воспалительных, геморрагических, раневых повреждений, снижения активности свертывающей системы крови.

Задачи исследования:

1. Исследовать противовоспалительное действие экстракта пиявки медицинской (ЭМП), мази и геля на основе ЭМП на моделях воспаления у животных при формалиновом отеке лапы

у мышей и «фетровой» гранулемы у крыс в сравнении с эффектами аналогичных лекарственных форм гепарина и диклофенака натрия.

2. Провести сравнительное исследование терапевтической эффективности ЭМП, геля с ЭМП и гепаринового геля при геморрагических повреждениях (экспериментальная подкожная гематома) мягких тканей у крыс.

3. Провести сравнительное исследование противовоспалительной активности при ранах и ожогах перспективных лекарственных препаратов с ЭМП, гепариновой мази и геля при наружном применении.

4. Исследовать противосвертывающую активность ЭМП, мази и геля с ЭМП в сравнении с активностью мази и геля гепарина при накожном применении у интактных кроликов.

5. Провести изучение острой токсичности, общетоксического и местнораздражающего действия разработанных мягких лекарственных форм на основе ЭМП, как потенциальных лекарственных средств.

Научная новизна

Впервые показано, что:

- субстанция, гель и мазь гирулюкс обладают высокой противовоспалительной эффективностью на модели формалинового отека лапы у мышей и «фетровой» гранулемы у крыс. По выраженности противовоспалительного эффекта препараты гирулюкс уступают мази с диклофенаком, но превосходят мазь с гепарином;
- ЭМП, гель и мазь на его основе в экспериментах на крысах проявляют противовоспалительную активность при ожогах, заключающуюся в ускорении заживления ожоговых травм;
- при накожных аппликациях происходит достоверное увеличение времени свертывания крови интактных кроликов в 1,3 раза при накожной аппликации мази гирулюкс, и в 1,2 раза, при аналогичной аппликации геля гирулюкс;
- ЭМП, разработанные мазь и гель ЭМП при накожном применении не вызывают летальных исходов или токсических эффектов вплоть до дозы 4000 мг/кг;
- по действию на гематологические, биохимические, интегральные показатели, функциональное состояние систем и органов, морфологическую структуру внутренних органов экспериментальных животных мягкие лекарственные формы ЭМП «гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения» не вызывают токсические эффекты, местное раздражающее действие в дозах, многократно превышающих терапевтические для человека.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты свидетельствуют о возможности регистрации в Российской Федерации потенциальных лекарственных препаратов «гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения» для применения в качестве

противовоспалительного и противосвертывающего средства на основе экстракта пиявки медицинской лиофилизированной.

Методология и методы исследования

Работа по изучению специфической фармакологической активности выполнена на лабораторных грызунах и включает эксперименты на интактных животных и животных с экспериментальным воспалением. ЭМП лиофилизированной применяли наружно в терапевтической дозе. Расчёт доз проводили, используя коэффициент пересчета доз с животного на человека согласно методическим указаниям, в "Руководстве по экспериментальному изучению новых фармакологических веществ" (2012). Исследование противовоспалительного действия ЭМП лиофилизированной и потенциальных мягких лекарственных форм на ее основе - «гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения» - проводили на моделях «формалинового» отека лапы у мышей и «фетровой» гранулемы у крыс (Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д., 2000). Ранозаживляющие свойства оценивали в экспериментах на крысах, которым наносили послойные кожные раны (Алипов В.В., 2010). Противоожоговые свойства изучали на модели ожогов кожи у крыс (Колсанов А.В., Алипов В.В., Добрейкин Е.А., 2011). Влияние на скорость рассасывания подкожных экстравазаций крови оценивали, моделируя геморрагические повреждения мягких тканей у крыс механическим воздействием (Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д., 2000). Оценку противосвертывающей активности осуществляли в экспериментах на кроликах, путем регистрации тромбозластограмм.

В соответствии с требованиями Минздрава России при регистрации лекарственные формы препарата подлежат токсикологическому исследованию в остром и субхроническом эксперименте с оценкой местного раздражающего действия. В соответствии с вышесказанным исследования выполняли согласно утвержденному письменному протоколу и стандартным операционным процедурам (СОП) лаборатории фармакологии АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ». В эксперименте определялись интегральные показатели, функциональное состояние основных систем: гематологические, биохимические показатели, гистологические изменения органов и тканей. В работе применялись фармакологические, гистологические, биохимические, статистические методы исследования.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в определении цели исследования и путей ее реализации, планировании и выполнении эксперимента. Все эксперименты проведены автором лично или при его активном участии. Автором проводились фармакологические и токсикологические виды исследований, анализ, статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. Публикации подготовлены при активном участии автора.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

В диссертационной работе использованы современные методики, позволяющие получить достоверную информацию о фармакологической активности (противовоспалительной, антикоагулянтной) потенциальных лекарственных препаратов на основе экстракта пиявки *Hirudo medicinalis*. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом проанализированного материала по изучаемой теме, использованием методик, адекватных поставленным задачам и применением современных методов анализа. Обоснованность научных выводов и положений подтверждается результатами проведенных экспериментальных исследований и не вызывает сомнений. Выводы объективно и полноценно отражают полученные результаты. С учетом вышеизложенного результаты проведенного исследования следует считать достоверными.

Основное содержание диссертации опубликовано в 15 научных работах, в том числе 7 в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации для публикации основных научных результатов диссертации.

Тема данного исследования утверждена на заседании Ученого совета АО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (протокол № 4 от 18.11.2014 г.) и включена в план научно-исследовательской работы (НИР).

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательской работы учреждений
Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной темы лаборатории фармакологии АО «ВНЦ БАВ» и ЗАО «МЦМП» на основании договора о совместном сотрудничестве.

Внедрение в практику результатов исследований

При изучении специфической фармакологической активности исследуемых препаратов определены показания к применению геля и мази. В рамках совместного научного сотрудничества АО «ВНЦ БАВ» с ЗАО «МЦМП» произведены опытно-промышленные партии потенциальных препаратов. Выявленная перспективность использования исследуемых препаратов на основе ЭМП Гирулюкс послужила обоснованием подготовки документации для регистрации лекарственных препаратов «Гирулюкс, мазь для наружного применения» и «Гирулюкс, гель для наружного применения».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. ЭМП в экспериментах на животных при накожном применении обладает противовоспалительной и противосвертывающей активностями, способности восстановления мягких тканей при геморрагических повреждениях.

2. «Гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения» с ЭМП лиофилизированной обладают противовоспалительной и противосвертывающей активностями в экспериментах на животных.

3. Мягкие лекарственные формы ЭМП («гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения») показали отсутствие выраженных токсических

эффектов (острая, хроническая токсичность и местнораздражающее действие) при накожных аппликациях у животных.

Апробация работы

Основные материалы диссертации представлены на научном конгрессе «Первый Всемирный конгресс гирудотерапии» (Москва, 2013 г.), «Человек и лекарство» (Москва, 2014, 2015, 2016 гг.); Международной научно-практической конференции «Медицина XXI века: лечение до достижения цели» (Красноярск, 2014 г.); расширенных заседаниях отдела фармакологии АО «ВНЦ БАВ» (2015 г.); II Международной научно-практической конференции «Перспективы развития современной медицины» (г. Воронеж, 2015 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Выполненная работа соответствует паспорту специальности 14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки): пункт 3 – «Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях а также на культурах клеток», пункт 5 – «Экспериментальное (доклиническое) изучение безопасности фармакологических веществ – токсикологические исследования, включающие изучение токсичности потенциальных лекарственных препаратов и их готовых лекарственных форм в условиях острых и хронических экспериментов на животных».

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 123 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), материалов и методов (глава 2), результатов исследований (главы 3-4), обсуждения результатов (глава 5), выводов, практических рекомендаций, списка литературы. В тексте содержится 26 таблицы, 8 рисунков. Список литературы включает 213 источника, 104 - отечественных и 109 – зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, определены цель работы, научная новизна и практическая значимость.

В первой главе (обзор литературы) проанализированы существующие представления об изучаемой проблеме, отражены актуальные на момент выполнения работы научные данные о степени изученности и обоснования биологических эффектов компонентов пиявки медицинской *Hirudo medicinalis* при различных заболеваниях. Подробный анализ современного состояния вопроса обосновывает перспективу применения лекарственных препаратов на основе экстракта *Hirudo medicinalis*.

Во второй главе приведены материалы и методы проведенного исследования. Описываются этапы экспериментальной работы, в соответствие с поставленными задачами и представлен набор научных методов, с помощью которых реализовано данное исследование.

Эксперименты по изучению фармакологической активности препаратов проведены на 100 мышах линий BALB/c обоего пола массой $20,2 \pm 0,4$ г, 320 аутбредных белых крысах обоего пола массой 190-200 г и 40 кроликах породы Шиншилла обоеих полов массой $2,5 \pm 0,5$ кг. Острую токсичность изучали на 120 самцах и самках аутбредных белых мышах массой $21,0 \pm 0,9$ г и 80 крысах обоеих полов массой $190 \pm 5,4$ г.

Эксперименты выполнялись согласно методическим руководствам и нормативным документам (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96; правила и Международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемые при экспериментальных исследованиях (1997); правила лабораторной практики (GLP) в Российской Федерации, утвержденные приказом Минздрава России от 01 апреля 2016г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»). Забой животных проводили с соблюдением требований, изложенных в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1997). В течение 24 часов до начала экспериментов все животные находились в условиях полной пищевой депривации со свободным доступом к воде, на момент выполнения исследований были здоровыми, без изменений поведения, режима сна и бодрствования, аппетита.

Работа проведена в соответствии с рекомендациями АО «ВНЦ БАВ» по исследованиям на животных и процедуры их проведения утвержденной этической комиссией АО «ВНЦ БАВ» (от 23.12.2014 протокол № 158 -2014).

Ранее в ЗАО «МЦМП» были разработаны нормативные документы ПР-18256912-02-06, а также ФСП-Р №001949/01-290411, в которых описаны параметры соответствия, условия контроля и производства ЭМП.

Для создания исследуемых препаратов использовались медицинские пиявки *Hirudo medicinalis*, выращенные в искусственных условиях в ЗАО «МЦМП», согласно промышленному регламенту ПР-18256912-02-06. Субстанция гирулюкс (лиофилизированный аморфный порошок от светло-серого до коричневого цвета со специфическим запахом; фармакопейная статья Минздрава России 42-2384-94) получен на ЗАО «МЦМП».

Объектами исследования являлись экстракт пиявки медицинской лиофилизированной (гирулюкс) ФСП-Р №001949/01-290411, «гирулюкс, мазь для наружного применения» и «гирулюкс, гель для наружного применения» производства ЗАО «МЦМП», Россия. Мазь и гель гирулюкс 1% - от светло-серого до темно-коричневого цвета со специфическим запахом.

В качестве препаратов сравнения использовали мазь гепарина (Гепариновая мазь; ОАО «НИЖФАРМ», Россия), гель гепарина (Heparin-Akhrigel 1000; Акрихин ХФК ОАО, Россия), мазь диклофенака (Ортофен, мазь 2%; ЗАО «Вертекс», Россия), гель диклофенака (Диклофенак гель 1%; ОАО «Биохимик», Россия).

Препараты сравнения применялись в тех же дозах, что и исследуемые потенциальные лекарственные средства по весу на килограмм массы тела для аналогичных экспериментальных

животных. У животных контрольной группы использовали изотонический раствор натрия хлорида.

Выбор эффективных доз осуществлялся на этапе скрининга. LD₅₀ определяли на этапе токсикологических испытаний для оценки токсического потенциала и соотношения токсических и терапевтических доз.

В работе дозы исследуемых мази гирулюкс 1% и геля гирулюкс 1%, переведены по межвидовому пересчету доз с человека на мышь (1:11), крысу (1:7) и кролика (1:3,2), составляли:

- для мышей 0,02 г (0,004 АТЕ) - на мышь массой 20 г (0,2 АТЕ/кг);
- для крыс 0,09 г (0,018 АТЕ) - на крысу массой 200 г (0,09 АТЕ/кг);
- для кроликов 0,54 г (0,09 АТЕ) - на кролика массой 3 кг (0,03 АТЕ/кг).

При изучении подострой токсичности животным ежедневно в течение 30 дней накожно наносили путем последовательных 3-4-кратных втираний на выстриженный участок кожи размером 2x2 см² гель в суммарной дозе 20 мг/4 см² (80 мг геля/кг), которая равнялась терапевтической для человека с учетом межвидового коэффициента переноса доз для крыс (1:7), 100 мг/4 см² (400 мг/кг) и 200 мг/4 см² (800 мг/кг) – дозы, равные терапевтической, в 5 раз и 10 раз ее превышающей.

Постановка эксперимента

Все исследования выполнены в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, Москва, 2012).

Острую, подострую токсичность и местное раздражающее действие мази и геля изучали в соответствии с требованиями и инструкциями Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (Миронов А.Н., 2012).

Сравнительная оценка противовоспалительного действия исследованных образцов и препаратов

Местную противовоспалительную активность экстракта пиявки оценивали на модели «формалинового» отека лапы у мышей (Г.А. Шварц, Р.Д. Сюбаев., 2012). Эксперименты выполнены с использованием мышей линии BALB/c обоего пола массой 20,2±0,4 г. Острый воспалительный отек вызывали субплантарным введением в заднюю лапу мыши 0,1 мл 2% водного раствора формалина. Подопытные животные были разделены на группы (по 10 мышей в каждой группе). Им наносили исследованные образцы мазей и гелей на подошву задней лапы с легким растиранием ежедневно в течение 10 дней. Выраженность отека оценивали, измеряя толщину лапки подопытного животного с помощью инженерного электронного штангенциркуля Vorel 15240 (Польша) до и через 4 часа после введения раствора формалина. Противовоспалительную активность выражали в доле угнетения отека (%). Расчеты проводили по формулам:

$$\text{Прирост объема (\%)} = \frac{\text{объем прав. лапы} - \text{объем лев. лапы} \times 100}{\text{объем левой лапы}}$$

$$\text{Торможение (\%)} = 100 - \frac{\text{прирост объема (опыт)} \times 100}{\text{прирост объема (контроль)}}$$

Оценка противовоспалительной активности препаратов пиявки медицинской у крыс на модели «фетровой» гранулемы

Эксперименты выполнены на 80 белых аутбредных крысах обоего пола массой 190-200 г (Г.А. Шварц, Р.Д. Сюбаев., 2012). Предварительно у подопытных животных удалили волосяной покров с помощью ножниц на медиальной части кожи спины площадью не менее 2x2 см². Хроническое пролиферативное воспаление вызывали имплантацией под кожу подготовленного участка простерилизованных кусочков фетра массой 40±2 мг. Операцию выполняли после использования местной анестезии (раствор лидокаина, 10%).

Ежедневно на выстриженный участок с легким растиранием наносили исследуемые препараты, животным контрольной группы – изотонический раствор натрия хлорида. На 8-е сутки после операции кусочки фетра с образовавшейся вокруг них грануляционной тканью извлекали, взвешивали на торсионных весах и высушивали до постоянной массы в течение 48 часов при 60°C. Пролиферативную реакцию (ПР) оценивали по разнице между массой высушенной гранулемы (M_{сух}) и исходной массой фетра (M_{исх}) (в мг). Экссудативную реакцию (ЭР) оценивали по разнице между массами сырой (M_{св}) и высушенной гранулемы (M_{сух}) (в мг).

Противовоспалительное действие (влияние на пролиферативный и экссудативный компоненты воспаления) выражали в процентах по отношению к контрольной группе.

$$\text{ПР (\%)} = \frac{\text{ПР}_{\text{контр}} - \text{ПР}_{\text{иссл}}}{\text{ПР}_{\text{контр}}}$$

$$\text{ЭР (\%)} = \frac{\text{ЭР}_{\text{контр}} - \text{ЭР}_{\text{иссл}}}{\text{ЭР}_{\text{контр}}}$$

Оценка терапевтического действия при геморрагических повреждениях (экспериментальная подкожная гематома)

Эксперименты выполнены на 30 белых аутбредных крысах (J.L. Nelissen et al. 2017). Предварительно у подопытных животных удаляли волосяной покров на части кожи спины площадью не менее 3x3 см². Геморрагические повреждения мягких тканей вызывали путем нанесения стандартного тупого удара фиксированной силы, при сохранении целостности кожных покровов и с использованием легкого эфирного наркоза. Исследование проводили с использованием местной анестезии (раствор лидокаина, 10%) при соблюдении правил асептики и антисептики. Крысам ежедневно в течение 6 дней накожно с легким втиранием наносили исследованные образцы до полного исчезновения гематом (Л.В. Подорольская с соавт., 2002). Животные контрольной группы наносили изотонический раствор NaCl. Определяли время заживления повреждений (Т) и рассчитывали процент изменений по формуле:

$$\text{изменения (\%)} = \frac{\text{Т}_{\text{оп}} - \text{Т}_{\text{контр}}}{\text{Т}_{\text{контр}}}$$

Оценка противовоспалительного действия при заживлении ран

Эксперименты выполнены на 30 белых аутбрендных крысах (Н.Ю. Фролова с соавт., 2009). Предварительно у подопытных животных удалили волосяной покров на части кожи спины площадью $3 \times 3 \text{ см}^2$. Послойные кожные раны наносили с помощью трафарета площадью 225 мм^2 с использованием местной анестезии (раствор лидокаина, 10%) при соблюдении правил асептики и антисептики. Заживление кожных ран происходило открытым способом. На кожу подопытных животных ежедневно наносили исследованные образцы. Оценку ранозаживляющего действия проводили аналогично описанной в предыдущем разделе.

Оценка противовоспалительного действия при экспериментальных ожогах

Ожоги спины IIIA степени у крыс вызывали прикладыванием на 10 сек к предварительно депилированной коже, разогретой до $200 \text{ }^\circ\text{C}$ медной пластины с силой 1,5 Н (Ю. Клебанова, 2005). Животным контрольной группы наносили изотонический раствор натрия хлорида. Нанесение травмы при сохранении целостности кожных покровов проводили с использованием местной анестезии (раствор лидокаина, 10%). Темпы заживления раневых повреждений у крыс из разных групп определяли, периодически снимая выкройки ран на кальку и взвешивая их. Оценку ранозаживляющего действия проводили аналогично описанной в предыдущем разделе.

Оценка противосвертывающего действия

Эксперименты выполнены на 40 кроликах породы Шиншилла, обоих полов массой 2,5-3 кг по 6 животных в группе (В.А. Макаров с соавт., 2012). В течение 10 дней подопытным животным наносили с легким втиранием исследуемое вещество на участок кожи с удаленным волосяным покровом площадью $2 \times 2 \text{ см}^2$. До эксперимента (контроль) и через 10 дней ежедневного накожного нанесения исследованных образцов из краевой вены уха забирали кровь для регистрации параметров тромбозаграммы. Об эффективности исследованных веществ судили по изменению времени свертывания в минутах.

Изучение острой токсичности геля и мази на основе экстракта медицинской пиявки

В опытах по определению острой токсичности (Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ, 2012) мазь и гель наносили на выстриженный участок кожи размером $1 \times 2 \text{ см}^2$ на спине белых нелинейных мышей-самцов путем втирания до полного всасывания за несколько раз до дозы 4000 мг/кг. Большую дозу достичь не удалось вследствие значительного затруднения поглощения геля и мази, и возникающих при этом потерь. Оценивали выживаемость животных в течение 14 суток после нанесения.

Подострая токсичность и местное раздражающее действие

Исследование субхронической токсичности гелевой и мазевой лекарственных форм экстракта медицинской пиявки проводили на крысах массой $190 \pm 5,4$ г. В подострых опытах животным наносили исследуемые препараты накожно в течение 30 дней в 1, 5 и 10-кратной терапевтической дозе для человека с учетом межвидового пересчета доз (1:7 для крыс) – 80, 400 и 800 мг геля, мази/кг. Испытанная максимальная доза в 70 раз превышает терапевтическую дозу для человека без учета межвидового пересчета доз.

Для расчета тестируемой дозы руководствовались следующим: терапевтическая доза геля и мази для крыс с учетом межвидового пересчета доз (Freireich E.J. et al., 1966) составляет $(250 \text{ мг}:90) \times 7 \approx 20$ мг/крысу массой 223-286 г (средний вес 250 г) или 80 мг геля/кг, где 250 мг - общая масса нанесенного геля/человека (90 - соотношение между площадью поверхности тела крысы и человека, 7 – межвидовой пересчет доз).

Опыты проводили в соответствии с Методическими рекомендациями (ред. А.Н. Миронов, 2014), наблюдали за поведенческими реакциями (локомоции), общим состоянием (состояние шерсти, двигательная активность и т.д.), потреблением пищи и воды, динамикой массы тела. До начала и после окончания введения препаратов животных взвешивали и помещали в обменные клетки на сутки при свободном доступе к воде для определения суточного диуреза и рН мочи (Шумская Н.И., Карамзина Н.Н., 1966). Состояние сердечно-сосудистой системы оценивали с помощью электрокардиографии во втором отведении до начала эксперимента и при его завершении. Влияние на функциональное состояние нервной системы определяли по показателям спонтанной двигательной активности (Буркацкая Е.М. и соавт., 1980). Местное раздражающее действие изучали при макроскопическом и микроскопическом исследованиях мест нанесения образцов, содержащих экстракт пиявки медицинской.

Статистический анализ

Статистический анализ данных проводили с использованием программ Microsoft Excel 2016 (Microsoft corp., USA), Statistica 13.2 (Dell inc., USA), IBM SPSS Statistics v25 (IBM corp., USA). Проверку нормальности распределения количественных переменных проводили с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова с поправкой Лилиефорса.

Сравнение количественных переменных в двух независимых группах проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Для трех групп пользовались критерием Краскела-Уоллиса с апостериорными сравнениями. Параметры нормальных распределений признаков в выборках описывали в формате $M \pm m$ (средние значения и среднеквадратическое отклонение).

Третья глава отражает результаты проведенного изучения специфической фармакологической активности субстанции, геля и мази гирулюкс.

Оценка противовоспалительной активности экстракта, мази и геля на основе экстракта пиявки медицинской при формалиновом отеке

Результаты исследования показали, что при субплантарном введении 0,1 мл 2% раствора формалина у подопытных мышей развивается выраженный отек лапы, о чем свидетельствует достоверное увеличение ее объема. Через 4 часа после введения формалина объем лапы у подопытных животных увеличился на $65,3 \pm 1,5\%$. При накожном нанесении ЭМП отмечается уменьшение выраженности индуцированного формалином отека лапы у мышей. Так, было выявлено, что под влиянием формалина объем лапы подопытных животных, получавших образец субстанции гирулюкс, увеличился на $45,3 \pm 0,5\%$, что в 1,4 раза ($p < 0,05$) меньше, чем в контроле.

Выраженность противовоспалительного эффекта мази гирулюкс, 1%, полученной на основе извлечения из пиявки медицинской лиофилизированной, в отношении «формалинового» отека лапы у мышей соответствовала активности водного извлечения ЭМП, тогда как гель с ЭМП действовал гораздо слабее (рис.1).

Наличие двух лекарственных форм (гель и мазь) обеспечивают более широкий спектр применения лекарственных средств на основе ЭМП. Гель, по сравнению с мазью, имеет кислотность, приближенную к кислотности здоровой кожи, поэтому считается более физиологичным средством. Мазь постепенно распределяется и впитывается медленнее, но в то же время ее липофильность способна обеспечить более выраженную чрезкожную проницаемость биологически активных веществ различного генеза. Гель обладает способностью, как подсушивать, так и насыщать кожу жидкостью за счет гидрофильных компонентов.

Вышесказанное проявилось также в отношении активностей ЭМП, мази и геля на основе ЭМП, мази и геля диклофенака и мази и геля гепарина.

Так, наибольший противоотечный эффект проявила мазь диклофенака ($28,8 \pm 4,7\%$), в 2,3 раза более выраженный ($p < 0,05$), чем гель диклофенака ($13,0 \pm 5,7\%$). Высокая достоверная эффективность наблюдается у ЭМП и мази на его основе, составившая $20,6 \pm 4,8\%$ и $20,9 \pm 5,2\%$, соответственно, против $13,2 \pm 4,0\%$ для геля на основе ЭМП, что в 1,2 раза более выраженный, чем для геля. Наименьший, но достоверный эффект выявлен для мази гепарина, составивший $16,4 \pm 4,4\%$ против $13,5 \pm 5,1\%$, или также в 1,2 раза более выраженный, чем для геля гепарина.

Результаты исследования показали, что противовоспалительное действие ЭМП и мази на основе ЭМП лишь в 1,37 раза менее выраженное, чем мази диклофенака при применении в эквивалентных дозах, но 1,28 раза более выраженное, чем мазь гепарина.

Таким образом, в ходе исследования выявлена относительно одинаковая эффективность препаратов на данной модели при стандартных режимах дозирования.



Рисунок 1. Влияние субстанции гирулюкс, мази и геля гирулюкс на выраженность «формалинового» отека лап мышей

Примечание: * - различия с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Оценка противовоспалительной активности субстанции, мази и геля ЭМП при «фетровой» гранулеме у крыс

Оценка пролиферативной реакции при «фетровой» гранулеме у крыс на 8 сутки не выявила достоверных отличий ни в одной из исследуемых групп по сравнению с контрольной группы (табл.1).

Таблица 1. Влияние экстракта пиявки, мази и геля на его основе (гирулюкс) на пролиферативную реакцию при «фетровой» гранулеме у крыс

Исследуемые препараты	Выраженность реакции на 8-й день после имплантации фетра под кожу подопытных крыс	Значение p (U-тест)
	Пролиферативная реакция, % M±m	
Субстанция гирулюкс	9,6±0,5	0,0913
Мазь гирулюкс, 1%	8,9±1,0	0,0998
Гель гирулюкс, 1%	10,6±1,5	0,0849
Мазь гепарина, 1000МЕ	8,6±1,4	0,1167
Гель гепарина, 1000МЕ	10,1±0,8	0,1735
Мазь диклофенака, 2%	9,7±0,9	0,0957
Гель диклофенака, 1%	9,8±0,9	0,0896
Контроль	9,4±0,8	0,0978

В то же время для эксудативной реакции достоверное уменьшение выявлено при применении субстанции ЭМП, мази на основе ЭМП, мази гепарина и мази диклофенака с $66,1 \pm 3,3\%$ в контроле до $52,5 \pm 2,0\%$, $57,5 \pm 4,1\%$, $56,6 \pm 2,7\%$, и $42,9 \pm 4,6\%$, соответственно. Для геля на основе ЭМП, геля гепарина и геля диклофенака отмечается лишь тенденция к уменьшению этого показателя (рис. 2).

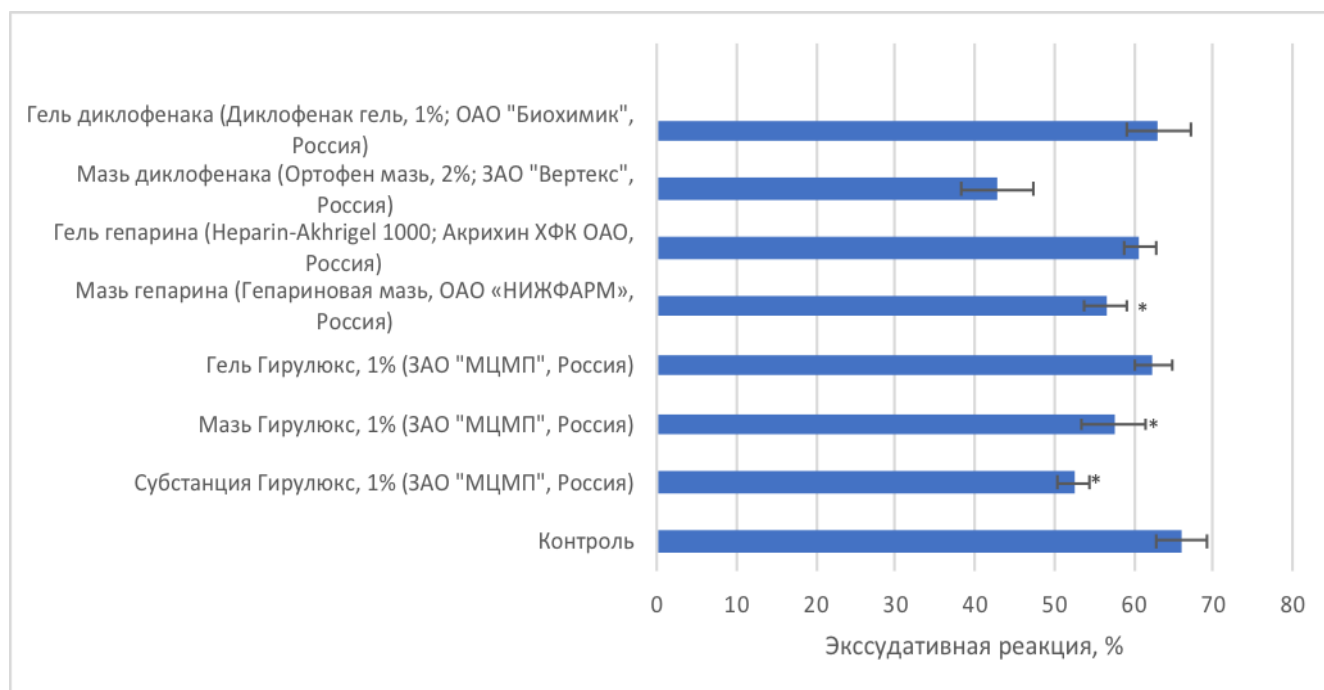


Рисунок 2. Влияние субстанции гирулюкс, мази и геля гирулюкс на выраженность эксудативной реакции при «фетровой» гранулеме у крыс

Примечание: * - различия с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Таким образом, анализ результатов экспериментального исследования противовоспалительной активности показал, что при накожном нанесении ЭМП на модели «фетровой» гранулемы у крыс отмечается уменьшение выраженности эксудативной реакции без влияния на пролиферативную.

Оценка действия исследуемых препаратов при геморрагических повреждениях мягких тканей у крыс (экспериментальная подкожная гематома)

Время рассасывания гематом после геморрагических повреждений мягких тканей (экспериментальная подкожная гематома) при использовании экстракта пиявки достоверно уменьшалось в среднем в 1,22 раза, а геля с ЭМП – в 1,16 раза.

Действия ЭМП, геля с экстрактом пиявки и геля гепарина при геморрагических повреждениях мягких тканей у крыс указывают на то, что как сам экстракт, так и гель с ЭМП при накожном нанесении в течение 10 суток приводят, в отличие от геля с гепарином, к

достоверному сокращению времени восстановления геморрагических повреждений мягких тканей у крыс (табл.2).

Таблица 2. Влияние препаратов гирулюкс (мазь, гель) и субстанции экстракта пиявки на течение геморрагических повреждений мягких тканей у крыс

Исследуемые препараты	Сроки восстановления тканей после геморрагических повреждений, дни	% изменений
Субстанция гирулюкс	3,6±0,2*	-13,6±4,5*
Мазь гирулюкс, 1%	3,8±0,4*	-13,2±3,5*
Гель гирулюкс, 1%	3,8±0,2*	-13,6±4,5*
Мазь гепарина, 1000МЕ	4,0±0,2	-12,1±5,4
Гель гепарина, 1000МЕ	3,9±0,3	-11,4±6,8
Мазь диклофенака, 2%	4,1±0,3	-12,3±4,8
Гель диклофенака, 1%	4,0±0,4	-12,1±4,3
Контроль	4,4±0,2	-0,0±4,5

Примечание: * - различия с контролем достоверны ($p < 0,05$)

Оценка противовоспалительного действия при заживлении ран

Достоверных различий в скорости заживления кожных ран при действии экстракта пиявки и мази с экстрактом пиявки отмечено не было, но наблюдалась тенденция к ускорению процесса заживления на 0,4 дня (4,8%) и на 0,3 дня (3,6%), соответственно (табл.3).

Таблица 3. Влияние субстанции экстракта пиявки и препаратов гирулюкс (мазь, гель) на скорость заживления послойных кожных ран у крыс

Исследуемые препараты	Сроки заживления после нанесения послойных кожных ран, дни	% изменений
Субстанция гирулюкс	8,0±0,2	4,8±2,5
Мазь гирулюкс, 1%	8,1±0,2	3,6±2,5
Гель гирулюкс, 1%	8,0±0,2	4,6±3,4
Мазь гепарина, 1000МЕ	7,9±0,3	5,9±3,8
Гель гепарина, 1000МЕ	7,7±0,4*	5,4±3,2*
Мазь диклофенака, 2%	7,5±0,2*	5,2±4,8*

Гель диклофенака, 1%	7,6±0,2*	5,3±4,5*
Контроль	8,4±0,20	0,0±2,40

По критерию Краскелла-Уоллиса не было выявлено достоверно значимых отличий между исследуемыми группами лекарственных средств ($p=0,18$).

Оценка противовоспалительного действия при ожогах

На 2-е сутки после операции у нелеченых крыс поверхность дефектов кожи покрывалась тонким струпом, образованным раневым отделяемым. При взятии животных в руки корочка легко повреждалась, просачивался экссудат. Были ярко выражены признаки воспаления - края раны имели отечность, гнойное воспаление на границе с омертвевшей тканью, расплавление некротических масс. В экспериментальных группах признаки воспаления были сглажены за счет выраженного антиэкссудативного действия исследуемых препаратов.

В таблице 4 приведены данные, указывающие на то, что применение субстанции ЭМП и мази с экстрактом пиявки достоверно ускоряло заживление ожогов кожи в среднем на 5 – 6 %.

Таблица 4. Влияние экстракта пиявки, препаратов на основе экстракта пиявки (гирулюкс) на скорость заживления ожогов кожи у крыс

Исследуемые препараты	Сроки заживления ожоговых ран, дни	% изменений
Субстанция гирулюкс	10,5±0,20*	5,0±1,67*
Мазь гирулюкс, 1%	10,4±0,20*	5,8±1,67*
Гель гирулюкс, 1%	10,4±0,40*	5,3±1,68*
Мазь гепарина, 1000МЕ	11,8±0,40	4,2±3,33
Гель гепарина, 1000МЕ	11,5±0,4	4,1±3,28
Мазь диклофенака, 2%	11,8±0,3	4,8±2,71
Гель диклофенака, 1%	11,7±0,2	4,7±2,68
Контроль	12,0±0,20	0,0±1,67

Примечание: * - различия с контролем достоверны ($p<0,05$)

Оценка влияния мази и геля с экстрактом пиявки на время свертывания крови у кроликов

Время свертывания крови подопытных животных при накожном нанесении экстракта пиявки достоверно увеличилось в среднем на 40%, мази с ЭМП на 30%, а при использовании

геля с ЭМП на 20%. В то же время препараты гепарина при такой постановке эксперимента оказались неэффективными (рис.3).

Таким образом, образцы ЭМП, мазь и гель на основе ЭМП при накожном нанесении проявили противовоспалительное и противосвертывающее свойства и являются перспективными средствами для получения различных лекарственных форм для наружного применения.

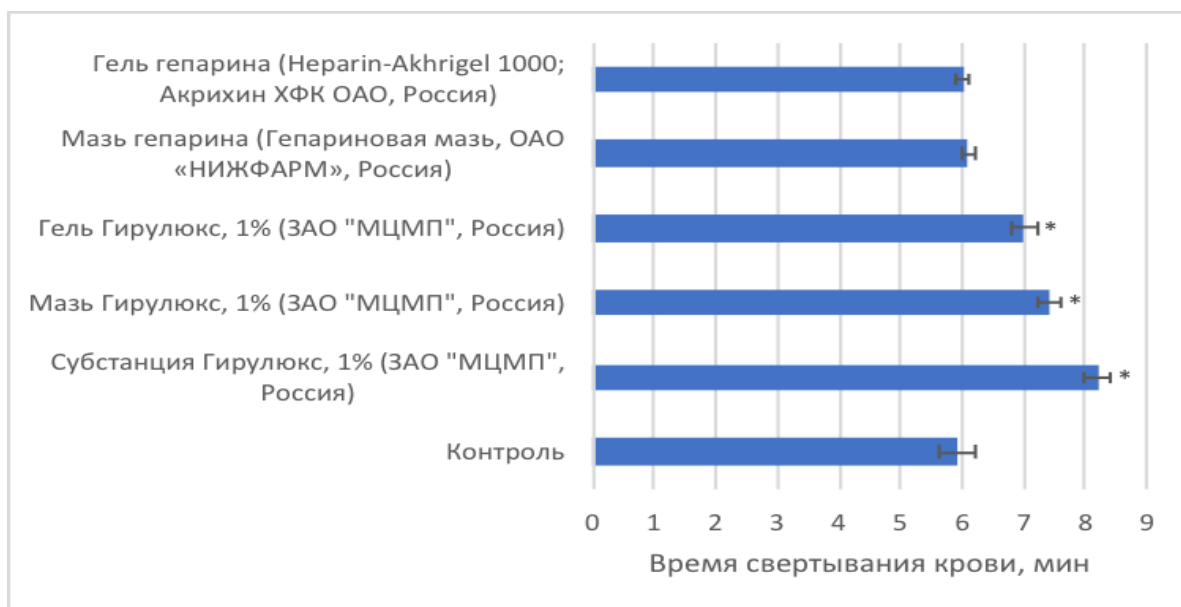


Рисунок 3. Влияние субстанции, мази и геля гирулюкс и гепарина на время свертывания крови у кроликов

Примечание: * - различия с контролем достоверны ($p < 0,05$)

В четвертой главе представлены результаты токсикологического исследования геля и мази на основе ЭМП.

Изучение острой токсичности геля и мази на основе ЭМП

Согласно результатам проведенного эксперимента, препараты гирулюкс не вызывали летальных исходов вплоть до максимально возможной вводимой дозы 4000 мг мази/кг. При этом отсутствовали признаки токсического действия препарата. В ходе изучения исследуемых препаратов существенных изменений в поведении животных отмечено не было. В течение дальнейших двух недель проводили наблюдения за двигательной активностью, наличием судорог, координацией движений, реакцией на раздражители, тонусом скелетной мускулатуры, дыханием, состоянием кожного покрова, шерсти и окраской видимых слизистых, потреблением воды и пищи. Достоверных заметных отклонений по сравнению с контрольной группой выявлено не было.

Таким образом, исследованные потенциальные препараты гирулюкс по параметрам острой токсичности представлены в значениях $LD_{50} > 4000$ мг мази и геля/кг, что соответствует 4 классу токсичности, то есть малотоксичным (в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76).

Изучение субхронической токсичности геля и мази на основе ЭМП

В результате проведения субхронического эксперимента на крысах при 30-дневном накожном нанесении мази и геля на основе ЭМП в дозах, соответствующих 1-, 5- и 10-кратной от терапевтической для человека с учетом межвидового пересчета доз получены результаты, свидетельствующие об отсутствии выраженных токсических эффектов исследованных образцов геля и мази, о чем свидетельствуют следующие данные:

- *масса тела и внутренних органов.* Общее состояние опытных животных, внешний вид, подвижность не отличались от контрольной группы. Субъективно наблюдается опрятность шерсти, наличие характерного для животных группы контроля блеска. Суточное потребление корма и воды подопытными животными при воздействии изучаемого препарата и контроля также не имели существенных различий.

- *состояние периферической крови.* При накожном нанесении исследованных образцов показатели периферической крови крыс (гемоглобин, эритроциты, лейкоциты, цветовой показатель, тромбоциты) подопытных групп не отличались от показателей контрольной группы и находятся в пределах нормальных значений для этого вида животных (Трахтенберг И.М. и др., 1978).

- *биохимические показатели.* После 30 дней накожного нанесения исследованных образцов не наблюдали отличий в содержании глюкозы, холестерина, белков, билирубина и креатинина, активности ферментов АлТ, АсТ в плазме крови у подопытных животных в сравнении с контрольными.

- *поведенческие реакции.* Поведенческие реакции подопытных животных по показателям спонтанной двигательной активности статистически достоверно не отличались от контрольных.

- *функциональное состояние печени и почек.* О функциональном состоянии печени и почек судили по биохимическим показателям крови крыс, а также по суточному диурезу животных. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что уровни биохимических показателей в плазме крови у крыс после многократного накожного нанесения исследуемых препаратов во всех испытанных дозах не претерпевали достоверных изменений в сравнении с таковыми в группе контрольных животных. Это характерно для активности аспартат-аминотрансферазы (АсАТ) и аланин-аминотрансферазы (АлАТ). Уровень креатинина в плазме крови также не изменился, как и уровень общего белка, белковых фракций и билирубина. Содержание общего холестерина и глюкозы не отличалось от контрольной группы животных. Суточный объем мочи в экспериментальных группах достоверно не отличался от контрольной,

что указывает на отсутствие влияния препаратов в испытанной дозе на функциональную активность почек.

- *функциональное состояние сердечно-сосудистой системы* - все изученные параметры остаются в пределах физиологических границ нормы.

Патоморфологическое исследование

Для патоморфологических исследований от животных контрольной группы, а также получавших в течение 30 суток указанные выше дозы опытного препарата, были изъяты: печень, почки, надпочечники, поджелудочная железа, тимус, 12-перстная кишка, селезенка, сердце. Кусочки нефиксированных органов после глубокого замораживания (для исключения артефактов) резали в криостате. Срезы окрашивали толуидиновым синим и эозином.

Макроскопическое исследование. У контрольных и опытных животных макроскопическая картина была идентичной. Шерстяной покров в опытных группах был опрятным с характерным для здоровых животных контрольной группы блеска. Кожа без изменений. При аутопсии расположение внутренних органов правильное. В брюшной и плевральной полостях не наблюдается свободной жидкости.

Макроскопическое исследование внутренних органов не выявило патологических изменений, вызванных введением исследованных образцов. При вскрытии трахеи и бронхов просвет свободен, легкие на разрезе характерного розового цвета. Сердце обычных размеров, на разрезе темно-красного цвета. Желудок и 12-перстной кишки без отеков и гиперемии слизистой оболочки. Печень на разрезе без признаков некроза. Почки, селезенка нормальных размеров без признаков патологии.

Макроскопическое изучение материала показало, что внутренние органы белых крыс, получавших испытуемые препараты, по форме и величине, цвету и характеру рисунка органа на разрезе не отличались от органов контрольных животных. Микроскопическое изучение препаратов всех групп показало сохранность гистологического строения внутренних органов.

Местное раздражающее действие

Местное раздражающее действие испытуемых образцов гирулюкс оценивали по реакции участков контакта введения препаратов экспериментальным животным.

Выраженное местно-раздражающее действие при макроскопическом и микроскопическом исследовании участков контакта с препаратом не выявлено.

Таким образом, определение относительной массы органов подопытных животных, получавших препараты гирулюкс в дозах 80, 400 и 800 мг мази/кг и геля/кг в течение 30 дней не выявило достоверных изменений по сравнению с контролем. Исследованные препараты при субхроническом исследовании - в течение 30 дней накожном нанесении в дозах 80, 400 и 800 мг мази/кг и геля/кг не вызывали существенных структурных изменений в органах и тканях подопытных животных. Проведенное исследование свидетельствует об отсутствии нарушений

в гистологическом строении внутренних органов: сердца, печени, почек, отделов желудочно-кишечного тракта (желудок, 12-перстная кишка, тонкий и толстый кишечник), поджелудочной железы, тимуса, селезенки и надпочечников, взятых у подопытных крыс, по сравнению с контрольными.

В главе пять приводится сравнение полученных данных исследования фармакологических свойств и токсикологического изучения препаратов на основе экстракта *Hirudo medicinalis* с данными литературы, а также обоснование возможности новых направлений исследования экстракта пиявки медицинской *Hirudo medicinalis* и лекарственных препаратов на его основе.

ЭМП, также, как и образцы «гирулюкс, гель для наружного применения» и «гирулюкс, мазь для наружного применения» при накожном применении проявили противовоспалительные и противосвертывающие свойства. Возможно, что противовоспалительное действие образцов, содержащих БАВ пиявки медицинской, обусловлено способностью некоторых биологически активных компонентов проникать через эпителий кожи и блокировать амилалитическую и кининогеназную активность медиаторов воспаления. Кининазы, обнаруженные в секрете слюнных желез пиявок, способны снижать активность альгогенного фактора брадикинина, обеспечивая тем самым обезболивающий эффект. При этом, фермент апираза, отщепляющий остаток фосфорной кислоты от АТФ, оказывает противовоспалительное действие при развитии воспалений, стимулируемых АТФ. Существенным противовоспалительным эффектом обладают эглины, ингибиторы эластазы и катепсина G гранулоцитов.

Механизм проникновения БАВ экстракта пиявки, по нашему мнению, осуществляется активным и пассивным транспортом и представлен на рисунке 4.

Пассивный транспорт обеспечивается гиалуронидазой - ферментом, катализирующим реакции гидролитического расщепления и деполимеризации гиалуроновой кислоты - компонента основного вещества соединительной ткани, который скрепляет отдельные тканевые элементы и клетки. Она облегчает проникновение в организм различных веществ, увеличивая проницаемость тканей, стенок капилляров.

МЕХАНИЗМЫ ПРОНИКНОВЕНИЯ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ ЭКСТРАКТА ПИЯВКИ

ПАССИВНЫЙ ТРАНСПОРТ

гиалуронидаза - фермент, катализирующий реакции гидролитического расщепления и деполимеризации гиалуроновой кислоты - компонента основного вещества соединительной ткани, который скрепляет отдельные тканевые элементы и клетки. Она облегчает проникновение в организм различных веществ, увеличивая проницаемость тканей, стенок капилляров

АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ

трансmemбранный перенос: структурная организация липосомы обеспечивает проникновение путем активного переноса через мембрану клетки (трансmemбранный перенос)

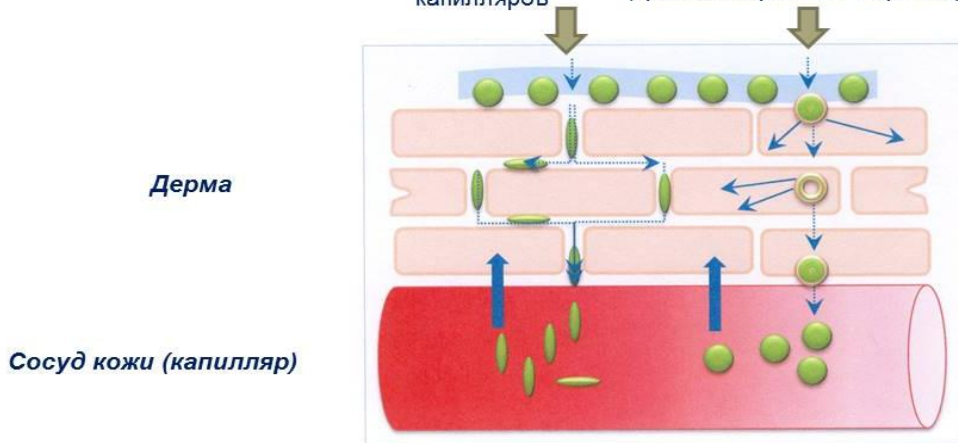


Рисунок 4. Гипотетические механизмы чрезкожной проницаемости БАВ экстракта пиявки медицинской в глубокие слои кожи и сосудистое русло, обеспечивающие местные и системные терапевтические эффекты

Трансмембранный перенос осуществляется структурно организованной липосомой, которая обеспечивает чрезкожную проницаемость активных компонентов экстракта медицинской пиявки путем активного переноса через мембраны клеток.

Таким образом, БАВ могут свободно проникать в глубокие слои кожи благодаря гиалуронидазе (по межклеточным контактам) и природной липосоме (трансmemбранный перенос).

Перспективы дальнейшей разработки темы. Полученные результаты изучения новых лекарственных форм на основе ЭМП доказывают возможность их применения в качестве эффективных противовоспалительных средств, что обеспечивает возможность их использования в различных областях медицины в качестве основного или дополнительного средства лечения. Доказанная эффективность ЭМП будет являться основой в дальнейшем изучении и создании новых лекарственных форм, таких как ректальные суппозитории, пероральные капсулы, крема и т.д.

Выводы

1. Экстракт пиявки медицинской, мазь 1% и гель 1% на основе экстракта при 3-4-кратном терапевтическом накожном нанесении мышам в дозе 0,02 г (0,004 АТЕ) на мышь массой 20 г (0,2 АТЕ/кг), достоверно ($p < 0,05$) угнетает отек лап при формалиновом отеке на 20.6, 20.9 и 13.2%, соответственно. По выраженности угнетения воспаления на модели формалинового отека потенциальные лекарственные средства на основе ЭМП и препараты сравнения могут быть расположены в ряд - мазь диклофенака > мазь ЭМП > ЭМП > мазь гепарина > гель гепарина > гель ЭМП > гель диклофенака. При моделировании фетровой гранулемы у крыс субстанция ЭМП достоверно уменьшает экссудативную реакцию на 21%, мазь с ЭМП на 13%, а мазь диклофенака на 35%. Пролиферативную реакцию достоверно не изменяет ни одно из изученных веществ.
2. ЭМП и гель с ЭМП, в отличие от геля гепарина, в дозе 0,09 г (0,018 АТЕ) достоверно уменьшают время восстановления тканей при геморрагических повреждениях у крыс в 1,22 и 1,16 раза, соответственно.
3. ЭМП и мазь на основе ЭМП, при накожном ежедневном нанесении в течение 12 дней при ожоговых повреждениях достоверно ускоряют заживление ожоговых ран в отличие от мази гепарина.
4. Ежедневное в течение 10 дней курсовое накожное нанесение кроликам мази с ЭМП в дозе 0,03 АТЕ/кг приводит к увеличению времени свертывания крови подопытных животных в среднем в 1,3 раза ($p < 0,05$), а при использовании геля с ЭМП в 1,2 раза ($p < 0,05$).
5. Острая токсичность мази и геля с ЭМП у мышей соответствует $LD_{50} > 4000$ мг/кг. В субхронических экспериментах на крысах при ежедневном в течение 30 дней накожном нанесении мази и геля, содержащих ЭМП, не оказывает местнораздражающего действия, общетоксических эффектов при регистрации гематологических, биохимических, интегральных показателей, функционального состояния систем и органов, состояния ЦНС, сердечно-сосудистой системы и морфологической структуры внутренних органов экспериментальных животных в дозах, многократно превышающих терапевтические для человека.

Практические рекомендации

Экстракт пиявки медицинской лиофилизированный является перспективным средством для получения на его основе лекарственных форм для наружного применения. Целесообразным представляется дальнейшее исследование тромболитической и профилактической активности изученных препаратов, а также их регистрация в качестве высокоэффективных лекарственных средств.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Исследование противовоспалительной активности водного извлечения из пиявки медицинской лиофилизированной / Попов Н.С., Демидова М.А., Лебедева А.О. // Традиционная медицина. – 2011. – № 5.– С. 335 – 338.
2. Сравнительная характеристика противовоспалительной активности мази и геля с экстрактом пиявки медицинской лиофилизированной / Попов Н.С., Демидова М.А., Шнеур С.Я., Лебедева А.О. // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – №2; URL: www.science-education.ru/102-5813 (дата обращения: 09.01.2017).
3. Противовоспалительное действие лекарственной субстанции гирулюкс в экспериментах на животных / Лебедева А.О., Никонов Г.И., Митрохин Н.М., Титова Е.А., Романенко Е.Б., Демидова М.А. // Тезисы докладов Первого Всемирного конгресса гирудотерапии. – 2013. – С. 73-74.
4. Сравнительный анализ противовоспалительного действия лекарственной субстанции гирулюкс / Лебедева А.О., Никонов Г.И., Романенко Е.Б., Митрохин Н.М., Титова Е.А. // Сборник материалов XXI Российского национального конгресса «Человек и лекарство», Москва – 2014. – С. 299-300.
5. Изучение токсичности препаратов накожного применения на основе экстракта медицинских пиявок в рамках доклинических испытаний / Никонов Г.И., Лебедева А.О., Митрохин Н.М. // Токсикологический вестник. – 2014. – № 3(126). – С. 33-39.
6. Гирудотерапия – традиции и новаторство / Лебедева А.О., Никонов Г.И., Митрохин Н.М., Романенко Е.Б. // Международная научно-практическая конференция «Медицина XXI века: лечение до достижения цели», Красноярск. – 2014. – С. 23.
7. Влияние водного извлечения из пиявки медицинской лиофилизированной на репаративные процессы при термических повреждениях кожи у крыс / Попов Н.С., Демидова М.А., Шестакова В.Г., Лебедева А.О. // Современные проблемы науки и образования. – 2014. - №3. – С. 731.
8. Противоотечное и противовоспалительное действия лекарственной субстанции Гирулюкс в экспериментах на животных / Лебедева А.О., Никонов Г.И., Митрохин Н.М. // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. - №1 (6). – С. 58-60.
9. Экстракт пиявок *Hirudo medicinalis* – биогенная субстанция для создания эффективных лекарственных средств / Никонов Г.И., Титова Е.А., Лебедева А.О. // Экспериментальная и клиническая фармакология – 2015. – Т.78, № 2, С. 15-19.
10. Влияние экстракта медицинских пиявок на течение острого экспериментального инфаркта миокарда у крыс / Лебедева А.О., Крыжановский С.А., Никонов Г.И. // CardioСоматика. – 2015. – № 4. – С. 227.

11. Способность к обучению и психо-эмоциональное состояние на фоне введения экстракта *Hirudo medicinalis* (в рамках доклинических испытаний) / Никонов Г.И., Каменский А.А., Лебедева А.О. // Перспективы развития современной медицины. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. – 2015. – С. 196-199.
12. Разработка лекарственной субстанции ГИРУЛЮКС на основе экстракта медицинских пиявок / Никонов Г.И., Титова Е.А., Капусткина Н.И., Лебедева А.О. // Асклепейон. – 2016. – № 1-4. – С. 18.
13. Доклинические испытания препаратов Гирулюкс на основе экстрактов пиявок медицинских / Никонов Г.И., Лебедева А.О., Титова Е.А., Митрохин Н.М. // Асклепейон. – 2016. – № 1-4 – С. 27.
- 14. Исследование фармакологических свойств экстракта *Hirudo medicinalis*, мази и геля на его основе при накожном применении в эксперименте / Митрохин Н.М., Ефимова А.О. // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 6; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=27090> (дата обращения: 31.10.2017).**
15. Экстракт медицинской пиявки как основа разработки топических препаратов / Митрохин Н.М., Лебедева А.О. // Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции. г. Москва, 15 ноября 2017 г. М. – 2017. - С. 92-94.

Список сокращений

- АлАТ - аланин-аминотрансферазы
- АлТ – аланинаминотрансфераза
- АсАТ - аспаргат-аминотрансфераза
- АсТ - аспартатаминотрансфераза
- АТФ – аденозинтрифосфат
- БАВ – биологически активное вещество
- ПР – пролиферативная реакция
- ЭМП – экстракт медицинской пиявки
- ЭР – экссудативная реакция
- НИР – научно-исследовательская работа